Die RNA prämeiotischer Zellen und ihre Beziehung zu postmeiotischen Störungen der Spermatogenese in Y-defizienten Männchen von Drosophila hydei

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Wolfgang Nellen
aus Velbert

Düsseldorf 1979

Die RNA prämeiotischer Zellen und ihre Beziehung zu postmeiotischen Störungen der Spermatogenese in Y-defizienten Männchen von Drosophila hydei

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wolfgang Nellen

aus Velbert

Düsseldorf

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	4
	1. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Geräte; Abkürzungen	4
	2. Genetische Konstitution der verwendeten Fliegenstämme	6
	3. Tierzucht und Materialbeschaffung	6
	3.1. Aufzucht der Larven	6
	3.2. Isolierung von Hodenanlagen aus Larven des 3. Larvenstadiums	6
	3.3. Isolierung von Hoden aus adulten Tieren	7
	3.4. Fraktionierung adulter Hoden	7
	4. Radioaktive Markierung und Organkultur	7
	4.1. Radioaktive Markierung von RNA und Proteinen in Organkultur	7
	4.2. Doppelmarkierungsexperimente	8
	4.3. Inhibierung der RNA-Synthese durch Actinomycin D	9
	5. RNA-Isolierung und Reinigung	9
	5.1. Nukleinsäureisolierung mit Proteinase K	9
	5.2. RNA-Reinigung über CsCl-Stufengradienten	9
	5.3. Isolierung poly(A)-haltiger RNA	10
	6. Isolierung von RNP-Fraktionen	11
	6.1. Isolierung von Polysomen aus larvalen Hodenanlagen	11
	6.2. Isolierung von RNP-Fraktionen nach vorheriger Abtrennung der Spermatocytenkerne	12
	7. Abschätzung von Sedimentationskoeffizienten	12
	8. Elektrophoresen	13
	8.1. Gelelektrophorese von RNA in exponentiellen Polyacrylamidgelgradienten	13
	8.2. Gelelektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidflachgelgradienten	13
	8.3. Isoelektrofocussierung von Proteinen	14

Seite

8.4. Verarbeitung der Proteingele 14

9. In vitro Translation und Test des Translationssystems 15

10. Fällung von Tubulinen mit Vinblastin 17

11. In-situ Hybridisierung mit cDNA 17

11.1. Synthese von cDNA mit AMV Reverse Transcriptase 17

11.2. Herstellung von Präparaten für die in-situ Hybridisierung 20

11.2.1. Präparation von polytänen Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsen 20

11.2.2. Präparation von Kernen primärer Spermatocyten aus larvalen Hodenanlagen 20

11.3. In-situ Hybridisierung von cDNA auf die RNA in Spermatocytenkernen und die DNA in polytänen Chromosomen 21

III. Ergebnisse 25

1. Vergleich der in-vivo synthetisierten Proteine aus Männchen mit vollständiger oder partieller Y-Defizienz und aus X/Y Männchen 25

2. In vitro Translationen 26

2.1. Translation von Gesamt-poly(A)$^+$-RNA aus larvalen Hodenanlagen 26

2.2. Translation der RNA aus Fraktionen der Polysomenisolierung 28

2.3. Translation der RNA aus Fraktionen der Kernisolierung 30

2.4. Translation der 10 000 g-P-RNA aus larvalen Hodenanlagen der Genotypen X/Y und X/O 34

3. Charakterisierung der in vivo synthetisierten Proteine im 52 000 Dalton Bereich 36

3.1 Coelektrophorese von Tubulin und Proteinen aus adulten Hoden im SDS-Polyacrlamidgel 36

3.2. Zweidimensionale Elektrophorese der 52 000 Dalton Proteine 37

3.3. Fällung der Tubuline mit Vinblastin 38

Seite

3.3.1. Vergleich des Vinblastin-fällbaren Materials aus X/Y und X/0 Hoden im SDS-Gel 39

3.3.2. Vergleich des Vinblastin-fällbaren Materials aus X/Y und X/0 Hoden durch Isoelektrofocussierung 40

3.3.3. Vergleich des Vinblastin-fällbaren Materials aus larvalen Hodenanlagen und aus adulten Hoden 42

4. Charakterisierung der in vitro synthetisierten Proteine mit einem Molekulargewicht von 52 000 Dalton 45

4.1. Zweidimensionale Elektrophorese der in vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P-RNA 45

4.2. Fällung der in vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P-RNA mit Vinblastin 46

5. Proteinsynthese in adulten Hoden nach einer Behandlung mit Actinomycin D 47

5.1. Translationsaktivität in verschiedenen Hodenteilen nach einer Behandlung mit Actinomycin D 48

5.2. Vergleich der neusynthetisierten Proteine aus Actinomycin D behandelten und aus unbehandelten Hoden 49

6. Charakterisierung der 10 000 g-P-Fraktion 50

6.1. Vergleich der poly(A)$^+$-RNA des 10 000 g-P aus X/Y und X/0 Tieren 50

6.2. Translation fraktionierter poly(A)$^+$-RNA aus dem 10 000 g-P 51

6.3. Vergleich der im 10 000 g-P enthaltenen RNPs aus X/Y und X/0 Hodenanlagen 52

6.4. Translation der RNA aus RNP-Fraktionen des 10 000 g-P 53

6.5. Untersuchung der Proteine der RNP-Fraktion III 55

7. In-situ Hybridisierung 57

7.1. Hybridisierung von 10 000 g-P-cDNA auf die RNA in Kernen primärer Spermatocyten 58

Seite

7.2. Hybridisierung von 10 000 g-P-cDNA
auf die DNA in polytänen Chromosomen 62

IV. Diskussion 63

V. Zusammenfassung 75

VI. Literaturverzeichnis 77

VII. Anmerkungen 83

VIII. Lebenslauf 84

I. Einleitung

In der ersten meiotischen Prophase treten bei vielen Tierarten Lampenbürstenchromosomen als eine besondere Form physiologisch aktiver Chromosomen auf. Besonders gut untersucht sind diese Strukturen in Oocytenkernen von Amphibien (Callan, 1957, 1963; Callan und Lloyd, 1960; Gall, 1963; Snow und Callan, 1968).
In den Kernen primärer Spermatocyten aller bisher untersuchter Drosophilaarten sind große distinkte Strukturen zu erkennen, die vom Y-Chromosom ausgespult werden und die als Lampenbürstenschleifen identifiziert wurden (Hess und Meyer, 1963). Nach histochemischen Untersuchungen bestehen die Lampenbürstenschleifen aus einer DNA-Achse, die von einer Matrix aus Protein und RNA umgeben ist (Hess und Meyer, 1963, 1968).

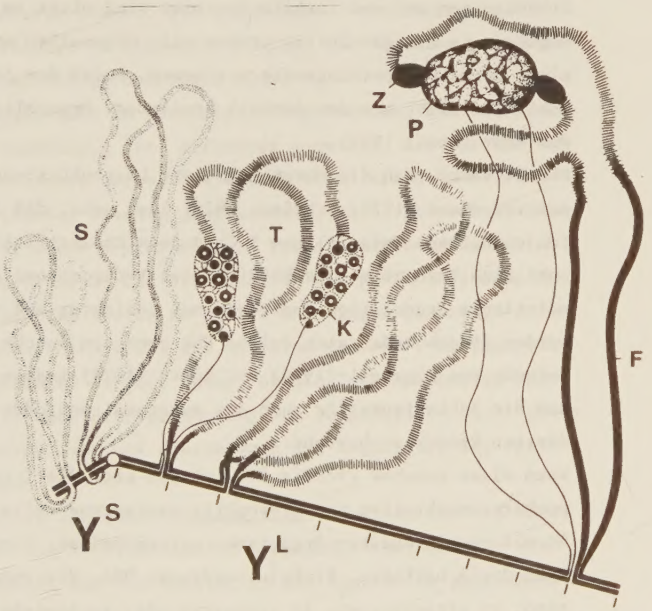


Abbildung 1: Schema des Y-Chromosoms von D. hydei während der Lampenbürstenphase (Erklärung s. Text). Das Schema wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. O. Hess zur Verfügung gestellt.

Bei der am besten untersuchten Art Drosophila hydei findet man fünf morphologisch unterscheidbare Schleifenpaare, deren Bildungsorte auf dem Y-Chromosom lokalisiert werden konnten (Abb. 1).
Die Schleifenbildungsorte für die zwei Schlingenpaare (S) befinden sich auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms (Y^S), die Loci für die Keulen (K) und die Tubulibänder (T) auf dem proximalen, die für den Pseudonukleolus (P) mit den Zapfen (Z) und die Fäden (F) auf dem distalen Teil des langen Arms (Y^L).
Die Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms werden als cytologische Manifestation der Aktivität sogenannter Fertilitätsfaktoren betrachtet: Tiere, denen aufgrund von Deletionen oder Inaktivierung ein oder mehrere Schleifenpaare fehlen, sind zwar von normaler Vitalität, die Spermiogenese verläuft jedoch ungeordnet (Meyer, 1963; Hess und Meyer, 1963; Hess, 1965): die Spermatiden in solchen Tieren weisen starke Schädigungen auf und fertile Spermien sind nicht zu beobachten. Wenigstens in einigen Zellen treten alle Organellen auf, die auch bei einer normalen Spermiogenese vorkommen, sodaß der Ausfall bestimmter Schleifen nicht mit dem Ausfall bestimmter Organellen korreliert werden kann (Hess, 1971).
Die Tatsache, daß die Morphologie der Lampenbürstenschleifen Y-autonom ist (Hess, 1971; Schäfer, 1975) legt nahe, daß das in den Schleifen enthaltene Material vom Y-Chromosom codiert ist; damit wäre sowohl eine Transcriptionsaktivität des Y-Chromosoms als auch eine prämeiotische Translation Y-chromosomal codierter RNA verbunden. Bisher wurden jedoch weder eine solche RNA noch ein solches Protein gefunden. Befunde von Kloetzel (1979) und Knust (1979) lassen hingegen vermuten, daß die Schleifenmatrix auch aus autosomal und/oder X-chromosomal codierten Produkten besteht.
Wenn diese Annahme richtig ist, würden sich die Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen von Drosophila wenigstens teilweise von ähnlichen Strukturen in anderen Organismen unterscheiden: ihre Funktion könnte dann darin bestehen, Proteine und/oder RNA, die anderweitig codiert sind, zu prozessieren, zu verpacken oder zu speichern (Kloetzel, 1979; Knust, 1979). Dieses Material könnte dann zu einem späteren Zeitpunkt der Spermatogenese bei der Organisation eines geordneten Entwicklungsablaufs wirksam werden.

Spermatiden, die aufgrund von Non-disjunction bei der Meiose nur noch das kleinste, punktförmige Autosom besitzen, sind in der Lage, sich zu funktionsfähigen Spermien zu entwickeln und führen zu lebensfähigen Tieren, wenn sie ein komplementär aneuploides Ei befruchten (Lindsley et al., 1969). Diese Ergebnisse und die Beobachtung, daß in postmeiotischen Stadien keine RNA-Synthese mehr nachgewiesen werden kann (Hennig, 1967; Lassak et al., 1979), zeigen, daß das biochemische Programm, das eine vollständige und geordnete Spermiogenese ermöglichen, bereits in prämeiotischen Stadien fertiggestellt sein muß. Die Ursachen für die normale und die gestörte postmeiotische Entwicklung müssen deshalb durch molekulare Unterschiede zwischen sterilen und fertilen Tieren in prämeiotischen Stadien nachweisbar sein.

Es ist das Ziel dieser Arbeit, die molekularen Voraussetzungen in prämeiotischen Stadien zu charakterisieren, die für eine geordnete postmeiotische Entwicklung notwendig sind.
Die Translationsaktivität in postmeiotischen Stadien, die von einer RNA-Neusynthese unabhängig ist, erfordert eine RNA, die bereits vor der Meiose synthetisiert wurde. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, in prämeiotischen Stadien gespeicherte, nicht-polysomale RNA zu suchen, die für diese postmeiotische Translation verantwortlich ist und dann zu prüfen, ob die Ursachen für die postmeiotischen Störungen in Y-defizienten Tieren in dieser RNA liegen könnten.
Der Vergleich einer solchen RNA aus normalen und aus Y-defizienten Tieren könnte Aufschluß darüber geben, ob die Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen auf die Speicherung und Organisation nicht polysomaler RNA einwirken und auf diesem Wege zur Regulation der Spermiogenese beitragen.
Durch die molekulare Charakterisierung ihrer Funktion für die Spermiogenese könnten die Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen von Drosophila ein Modell für die Regulation der Expression genetischer Information bei Eukaryonten darstellen.

II. Material und Methoden

1. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Geräte; Abkürzungen

Acrylamid: Serva, Heidelberg

Bisacrylamid: Serva, Heidelberg

Brij-35: Serva, Heidelberg

Cycloheximid: Nutritional Biochemical Corporation, Ohio, USA

Formamid: Merck, Darmstadt; 100 ml Formamid wurden mit 2 g Amberlite MB 1 Ionenaustauschharz (Serva, Heidelberg) deionisiert.

Gardol: Sigma Chemie, München

Heparin-Natrium: Serva, Heidelberg

Nonidet P-40: Fluka Chemie, Buchs

oligo d(pT)$_{12-18}$: Boehringer, Mannheim

poly(U)-Sepharose 4 B: Pharmacia, Uppsala

Radiochemikalien: 5-^{3}H -Uridin (26 Ci/mmol); ^{14}C(U) -Uridin (464 mCi/mmol); 4,5-^{3}H(N) L-Leucin(40 Ci/mmol); ^{14}C-(U)L-Leucin(270 mCi/mmol); L-^{35}S-Methionin (110 Ci/mmol); 5-^{3}H Desoxycytidin 5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz (22,1 Ci/mmol); 8-^{3}H(N) Desoxyadenosin 5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz (15 Ci/mmol); 8-^{3}H Desoxyguanosin 5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz (12 Ci/mmol); methyl-^{3}H Desoxythymidin 5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz (62,9 Ci/mmol). Alle von NEN, Dreieich.

Saccharose: ultra pure, RNase-frei; Schwarz/Mann, Heidelberg

Schneider's Drosophila Medium; Biol. Comp., Grand Island

Sephadex G-75: Pharmacia, Uppsala

Silikonisierungslösung: 5% Dimethyldichlorsilan in Benzol

Spermin: Serva, Heidelberg

Szintillationschemikalien: Monophase-40, Carbo-Sorb, Permafluor, Instagel II, Packard Instr., Frankfurt.

Vinblastin-Sulfat: Sigma Chemical Company, St. Louis, USA

Triton X100: Packard Instr. Frankfurt

Proteinase K: Merck, Darmstadt; die Proteinase K-Lösung wurde vor Gebrauch eine Stunde bei 37°C vorinkubiert.

RNase A: Boehringer, Mannheim. Die RNase-Lösung wurde vor Gebrauch 10 Minuten bei 80° erhitzt.

Kühlzentrifuge: Sorvall RC 2B, HB-4 Rotor

präparative Ultrazentrifuge: Beckman L5-65

Szintillationszähler: Packard-Tri-Carb Flüssigkeitszintillationszähler Modell 3380 mit angeschlossenem Absoluten Aktivitätsanalysator 544 oder Modell 2650

Fraktionenkollektor: ISCO-Gradientenfraktionator 640. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 254 nm mit dem ISCO UA-5 Monitor

Probenverbrennungsautomat: Packard 306

Chromoscan-Gelscanner; die Absorptionsmessung erfolgte bei 260 nm bzw. 620 nm

Gradientenmischer: 11300 LKB Ultrograd

Stromversorgungsgerät: Ortec 4100 pulsated constant power supply

Bis: N,N'-Methylenbisacrylamid

Brij-35: Polyäthylenglykolmonolauryläther

BSA: Rinderserumalbumin

DNA: Desoxyribonukleinsäure

- cDNA: komplementäre, revers transcribierte DNA

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

Gardol: Natrium-N-lauroyl-sarkosinat

K(OAc): Kaliumacetat

$Mg(OAc)_2$: Magnesiumacetat

h: Stunden

RNA: Ribonukleinsäure

- rRNA: ribosomale RNA
- mRNA: messenger RNA
- tRNA: Transfer-RNA

RNP: Ribonukleoprotein

rpm: Rotorumdrehungen pro Minute

SDS: Natriumdodecylsulfat

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TCA: Trichloressigsäure

2. Genetische Konstitution der verwendeten Fliegenstämme

Die Untersuchungen wurden an den Düsseldorfer Stämmen von Drosophila hydei aus den Zuchten von Herrn Prof. Dr. Oswald Hess durchgeführt. Neben dem Wildtypstamm wurden Tiere mit den genetischen Konstitutionen X/A.Y^{PF} und X/$^{S.KT}$Y-A verwendet. Diese Tiere wurden durch entsprechende Kreuzungen aus den Translokationsstämmen KOM 290/2 und 697/16 gewonnen (Hess, 1967, 1968).
Massenkulturen von Y-defizienten Männchen (X/O Männchen) wurden nach der Methode von Beck (1976) und Schäfer (1978) durch Kreuzung von XX/O Weibchen mit Wildtyp Männchen angelegt.

3. Tierzucht und Materialbeschaffung

3.1. Aufzucht der Larven

Zuchten von Drosophila hydei wurden auf einem Nährbrei aus Maisgries, Sojamehl, Malzextrakt, Zuckerrübensirup, Bierhefe, Agar und Wasser bei einer konstanten Temperatur von 23°C gehalten. Die Larvenkulturen wurden grob synchronisiert, indem die Eiablage von etwa 40 Elterntieren pro 50 ml Nährbrei auf maximal 20h beschränkt wurde. Dadurch konnte eine optimale Populationsdichte und eine ungehinderte Entwicklung der Tiere erreicht werden.

3.2. Isolierung von Hodenanlagen aus Larven des 3. Larvenstadiums

Die Hodenanlagen wurden in Anlehnung an die Methode von Boyd et al. (1968) und Schwochau (pers. Mitt.) isoliert. Die Organe wurden aus dem gereinigten Larvenhomogenat in Drosophilaringer (0.184M KCl, 0.046M NaCl, 0.003M CaCl, 0.01M Tris-HCl ph 7.2) mit einer Pinzett gesammelt und in Schneider's Drosophila Medium mit 10 µg Rifampicin/ml (Schwochau, pers. Mitt.) überführt.

3.3. Isolierung von Hoden aus adulten Tieren

Aus adulten Männchen, die auf Eis stillgelegt waren, wurden die Hoden mit einer Dumont Pinzette No5 so herauspräpariert, daß ihre spiralige Form erhalten blieb und sofort in Schneider's Drosophila Medium überführt.

3.4. Fraktionierung adulter Hoden

Nach der Methode von Lassak (1979) wurden Hodenteile mit definiertem Inhalt präpariert. Nach der Lokalisierung der verschiedenen Spermatogenesestadien in einem Hoden wurden die Organe aus einer gleichaltrigen Population mit einer Dumont Pinzette No5 in entsprechende Teile zerschnitten. Die Pinzette wurde dazu so verbogen, daß die Schenkel vorne aneinander vorbeiliefen und wie eine Schere wirkten.

4. Radioaktive Markierung und Organkultur

4.1. Radioaktive Markierung von RNA und Proteinen in Organkultur

Radioaktive Vorstufen wurden eingedampft und in Inkubationsmedium aufgenommen. Für die Markierung von RNA wurde käufliches Schneider's Drosophila Medium verwendet, für die Markierung von Proteinen wurde das Medium nach den Anweisungen von Schneider (1966) unter Auslassung der Aminosäuren, die als radioaktive Vorstufen zugesetzt werden sollten, selbst hergestellt. Auf die Zugabe von Vitaminen und Antibiotika wurde verzichtet.
Die Inkubation erfolgte in einer Ringer-feuchten Kammer bei 24°C für 24h (wenn nicht anders angegeben). Die Inkubation wurde durch gründliches Spülen mit Ringer und Homogenisation der Organe abgebrochen.

4.2. Doppelmarkierungsexperimente

Um zwei Protein- oder RNA-Proben miteinander zu vergleichen, wurden Doppelmarkierungsexperimente durchgeführt.

Mit dieser Methode wurde die Wirkung von Actinomycin D auf die Proteinsynthese untersucht, und es wurde die Protein- und RNA-Synthese in verschiedenen Genotypen und verschiedenen Stadien der Spermatogenese verglichen. Dazu wurde die eine Organkultur in Gegenwart von ^{3}H markierten RNA- oder Proteinvorstufen inkubiert, die andere in Gegenwart der entsprechenden ^{14}C markierten Vorstufen. Nach der Inkubation und nach gründlicher Spülung wurden die beiden Proben vereinigt und von diesem Zeitpunkt an gemeinsam weiterverarbeitet.
Die zu untersuchenden Moleküle wurden in Polyacrylamidgelgradienten aufgetrennt und die Gele mit einem Mickle-Gelslicer in Scheiben geschnitten, auf aschefreiem Schleicher+Schüll Weißband-Filterpapier getrocknet und zur Isotopentrennung in einem Packard 306 Sample-Oxidizer verbrannt; Tritium wurde als Wasser in 12 ml Monophase 40 aufgefangen und ^{14}C als CO_2 in 6 ml Carbosorb absorbiert und mit 12 ml Permaflour-Szintillator versetzt. Die Radioaktivität der Proben wurde im Szintillationszähler bestimmt.
Für jede Gelscheibe wurde der Quotient ^{14}C dpm/^{3}H dpm (C/T-Verhältnis) gebildet und über der Radioaktivitätsverteilung des entsprechenden Gels in halblogarithmischem Maßstab eingezeichnet. Bei gleichem Einbau der radioaktiven Vorstufen sollte das C/T-Verhältnis eine waagerechte Gerade ergeben; Abweichungen von der Geraden nach oben bedeuten in diesem Fall eine vermehrte Synthese in der ^{14}C markierten Probe.
Durch die gemeinsame Aufarbeitung und Auftrennung besteht absolute Sicherheit, daß wirklich identische Moleküle verglichen werden.
Zuckergradienten mit doppeltmarkierten Proben wurden mit einem Isco-Gradientenanalysator 640 in 0.2 ml Schritten fraktioniert und gleichzeitig die optische Dichte bei 254 nm mit einem UA-5 Monitor vermessen.
Die Fraktionen oder Aliquots davon wurden in Packard Combustioncones gefüllt, getrocknet und wie die Gelscheiben verbrannt und ausgewertet.

4.3. Inhibierung der RNA-Synthese durch Actinomycin D

Actinomycin D wurde in einer Konzentration von 0.3 µg/ml Schneider's Medium eingesetzt (Nellen 1975).

Adulte Hoden wurden 3h bzw. 12h in diesem Medium vorinkubiert und dann in ein Blockschälchen überführt, in dem zuvor ^{3}H-Leucin eingedampft worden war. Der Abbruch der Inkubation und die Aufarbeitung der Proteine erfolgte wie bei Kloetzel (1979) beschrieben.

5. RNA-Isolierung und Reinigung

5.1. Nukleinsäureisolierung mit Proteinase K

RNA aus ganzen Hoden, Hodenanlagen, Hodenfraktionen oder RNP-Fraktionen wurde durch Behandlung mit Proteinase K (100 µg/ml) in einem Puffer mit 0.01M Tris-HCl pH 7.4 und 1% SDS freigesetzt. Die Proteinverdauung erfolgte entweder 30 Minuten bei 37°C oder 1-2 Stunden bei Zimmertemperatur. Danach wurde unter Zugabe von 1/10 Volumen Kaliumacetat (2M) mit 2.5 Volumen Äthanol bei -30°C über Nacht gefällt.

5.2. RNA-Reinigung über CsCl-Stufengradienten

In den meisten Fällen wurde die gefällte RNA nach der Methode von Glisin et al. (1974), um DNA und Proteine abzutrennen, gereinigt. Dazu wurde das rohe Nukleinsäure-Pellet in 1.5 ml einer Lösung aus 0.1M Tris-HCl pH 8, 4% Gardol aufgenommen und mit 1.5 g festem CsCl gemischt. Diese Lösung wurde in einem Polyallomer-Zentrifugenröhrchen über ein Kissen von 6M CsCl (ρ = 1.802), 0.01 EDTA geschichtet und mit Tris-Gardol-Lösung (siehe oben) aufgefüllt. Nach einer Zentrifugationszeit von 9-12 Stunden bei 35 000 bis 42 000 rpm und 20°C wurde der Röhrchenboden schrittweise mit 1 ml poly(A)-Bindungspuffer (0.01M Tris-HCl pH 7.6, 0.5M NaCl) ausgespült und die Probe in dieser Form zur Isolierung poly(A)-haltiger RNA weiterverarbeitet.

5.3. Isolierung poly(A)-haltiger RNA

Die Isolierung poly(A)-haltiger RNA wurde zunächst an poly(U)-Sepharosesäulen (Pharmacia) durchgeführt. Später wurde oligo-(dT) Cellulose (Boehringer) verwendet, weil die RNA-Desorption von späteren poly(U)-Sepharose-Chargen gar nicht oder nur zu geringen Prozentsätzen möglich war.
Lösungen (Lubsen pers. Mitteilung):

TES-Bindungspuffer:	TES-Elutionspuffer:
0.01M Tris-HCl pH 7.4	0.01M Tris-HCl pH 7.4
0.01 M EDTA	0.01M EDTA
0.5% SDS	0.5% SDS
0.5M NaCl	

Die Affinitätschromatographie wurde an Cellulose und an Sepharose mit den gleichen Lösungen durchgeführt.
Die RNA wurde normalerweise in 1 ml Bindungspuffer aufgenommen, 2 Minuten bei 80°C denaturiert, kurz in Eis gekühlt und dann zweimal hintereinander über eine 0.3 ml-Säule gegeben. Anschließend wurde mit 3 ml Bindungspuffer bei Zimmertemperatur nachgewaschen; die gebundene poly(A)-haltige RNA wurde dann bei 50°C mit 3 ml Elutionspuffer eluiert. Nach Equilibrierung mit mindestens 5 ml Bindungspuffer konnte die Säule erneut verwendet werden.
RNA-Proben, die später für die Translation verwendet werden sollten, wurden mit Bindungspuffer und Elutionspuffer ohne SDS und EDTA über die Säule prozessiert, um das bei der in-vitro Translation störende Detergenz zu vermeiden, und um eine Quantifizierung der RNA durch Messung des OD_{260} zu ermöglichen (EDTA absorbiert bei 260 nm).

Die RNA wurde mit 1/10 Volumen 2M Kaliumacetat und 2.5 Volumen Äthanol gefällt.

6. Isolierung von RNP-Fraktionen

6.1. Isolierung von Polysomen aus larvalen Hodenanlagen

Lösungen zur Polysomenisolierung (Lassak, pers. Mitt.):

Lösung A:	Steril-Ringer:
50 mM KCl	0.2M KCl
10 mM $MgCl_2$	0.045M NaCl
200 mM Tris-HCl pH 8.5	0.01M Tris-HCl pH 7.2
10 µg/ml Cycloheximid	10 µg/ml Cycloheximid

Extraktionslösung:

9.15 ml Lösung A
8.5% Saccharose
2 mg/ml Heparin
500 µg/ml tRNA
200 mM Ammoniumchlorid

Zur Isolierung membrangebundener Polysomen wurde 1% Triton-X-100 zugesetzt.

Alle Lösungen wurden mit drei-fach destilliertem Wasser in sterilen Gefäßen angesetzt und bei -30°C aufbewahrt.

Die Organe wurden gründlich mit Steril-Ringer gespült und in einen 1 ml-Dounce-Homogenisator überführt. Der Ringer wurde soweit wie möglich abgesaugt. Die Organe wurden dann je nach Menge in 0.4 bis 0.8 ml Extraktionslösung mit fünf Stößen des leichgängigen Pistills homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert. Dabei entstehen ein festes Pellet und ein polysomaler Überstand. Das Pellet wurde mit Steril-Ringer gewaschen (10 000 g-P/Pol), der Überstand in einem 15% bis 45%igen Saccharosegradienten 90 Minuten bei 200 000 g (Beckman SW 40 Ti-Rotor) aufgetrennt. Von dem Gradienten wurde nach der Zentrifugation etwa das Volumen der aufgegebenen Probe abgesaugt und verworfen. Anschließend

wurde der Gradient mit einem Isco-Gradientenanalysator mit UA 5 Monitor bei 254 nm durchgemessen. Ribosomale Untereinheiten, Mono- und Disomen wurden in einer Fraktion zusammengefaßt, die als freie RNPs ("RNP") bezeichnet wurde. Der Rest des Gradienten wurde als Polysomen (Pol) bezeichnet und zusammengefaßt. Die Gradientenzentrifugation wurde durchgeführt, um die beiden Fraktionen "RNP" und "Pol" zu trennen und um eine Kontrolle über die Ausbeute und die Verteilung der Polysomen in der jeweiligen Isolierung zu haben. Alle Arbeiten wurden bei $0^{o}C$ durchgeführt.

6.2. Isolierung von RNP-Fraktionen nach vorheriger Abtrennung der Spermatocytenkerne

Zur Isolierung von Spermatocytenkernen wurde die Methode von Knust (1979) verwendet.
Larvale Hodenanlagen wurden gründlich mit Ringer gespült und in einen 1 ml-Dounce-Homogenisator überführt. Die Organe wurden dann in 0.8 ml Isolationspuffer (0.1 M NaCl, 0.0019 M KCl, 0.01 M Tris, 0.0025 M $MgCl_2$, 0.001% Spermin, 0.5% Nonidet P 40, pH 7.2) mit drei Stößen des schwergängigen Pistills homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine Gaze mit 69 µm Maschenweite filtriert und 1.5 Minuten bei 100 g zentrifugiert (Sorvall RC2B, HB-4 Rotor); es entstehen ein cytoplasmatischer Überstand und ein Pellet, das den größten Teil der Spermatocytenkerne enthält.
Der cytoplasmatische Überstand wurde erneut bei 10 000 g für 20 Minuten zentrifugiert; es entstehen ein festes Pellet (10 000 g-P/K) und ein Überstand (Ü). Alle Arbeiten wurden bei $0^{o}C$ durchgeführt.

7. Abschätzung von Sedimentationskoeffizienten

Die Abschätzung von S-Werten erfolgte mit Hilfe der Tabellen von McEwen (1967). Dabei wurde für RNA eine Dichte von 1.9 g/cm^3 und für RNPs eine Dichte von 1.6 g/cm^3 angenommen. Weil die Dichte der RNPs nicht bestimmt wurde, handelt es sich hier um Annäherungswerte.

8. Elektrophoresen

8.1. Gelelektrophorese von RNA in exponentiellen Polyacrylamidgelgradienten

2.1% bis 15% exponentielle Gelgradienten mit einer Halbwertslänge von 2.5 cm wurden in Anlehnung an Mirault et al. (1971) hergestellt, wie bei Lassak (1975) und Nellen (1975) beschrieben. Dabei war die 2.1% Lösung 6, die 15% Lösung 4.5 molar an Harnstoff.

8.2. Gelelektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidflachgelgradienten

9% bis 20% SDS-Polyacrylamidflachgelgradienten wurden wie bei Kloetzel (1979) beschrieben hergestellt. Der Gradientenverlauf ist in Abb. 2 dargestellt.

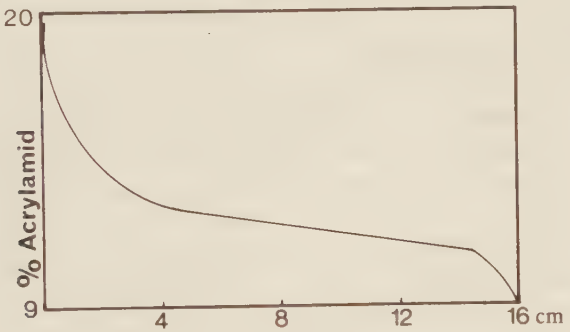


Abbildung 2: Verlauf der Acrylamidkonzentration im SDS-Polyacrylamidflachgelgradienten.

Zur Berechnung von Molekulargewichten wurden als Eichproteine Trypsininhibitor aus Sojabohnen (21 500 Dalton), Rinderserumalbumin

(68 000 Dalton), und RNA-Polymerase aus E.coli (165 000, 155 000 und 39 000 Dalton) coelektrophoretisiert.

8.3. Isoelektrofocussierung von Proteinen

Die Isoelektrofocussierung wurde in Anlehnung an die Methode von O'Farell (1975) durchgeführt, wie bei Kloetzel (1979) beschrieben. Für die zweidimensionale Elektrophorese wurden die zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proben im ungefärbten Gel lokalisiert, indem die Radioaktivitätsverteilung in einem Aliquotstreifen bestimmt wurde. Andere Proben wurden in Äquilibrierungspuffer aufgenommen oder mit Harnstoff gesättigt, sodaß einerseits die Denatunierung gewährleistet und andererseits eine mühelose Überschichtung der Probe möglich war.
Für die hier beschriebenen Experimente wurden zwei verschiedene Chargen der Ampholine mit sehr unterschiedlichen Trenneigenschaften verwendet. Trennungsunterschiede in den gezeigten Focussinggelen sind zum größten Teil darauf zurückzuführen.

8.4. Verarbeitung der Proteingele

Polyacrylamidflachgele, in denen ^{35}S markierte in-vitro Translationsprodukte aufgetrennt waren, wurden nach der Methode von Laskey und Mitarbeitern (Laskey et al., 1975; Bonner et al., 1974) für die Fluorographie vorbereitet.
Das gefärbte Gel wurde zweimal 30 Minuten entwässert, und anschliessend 3h in einem Bad mit 24.5 g PPO in 100 ml DMSO mit dem Szintillator imprägniert. Weil eine Trocknung der Gelgradienten nicht möglich ist, wurde auf die Wässerung der PPO imprägnierten Gele verzichtet, um ein Reißen des Gels beim Tieffrieren möglichst zu vermeiden. Das Gel wurde auf einer Glasplatte mit Melitta-Haushaltsfolie abgedeckt und mit Kodak X-omat Royal Film belegt. Die Exposition erfolgte bei -80°C für durchschnittlich drei Tage. Die Filme wurden 1.5 Minuten in Kodak D 19 Entwickler entwickelt, 1 Minute in Wasser gespült, 15 Minuten fixiert und 15 Minuten gewässert. Weil die feuchten Gele stark unter wiederholtem Auftauen und Einfrieren leiden und die Schrumpfung in DMSO/PPO die Auflösung verringert, wurden die Gele zum Teil auch in 1 mm-Scheibchen

geschnitten, in Instagel-Scintillationscocktail überführt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

9. In vitro Translation und Test des Translationssystems.

Gereinigte (siehe Kapitel 5) und gefällte poly(A)-haltige RNA wurde in 0.5 ml H_2O aufgenommen und in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß umgefällt (-30°C mindestens 10 Stunden). Die RNA wurde dann pelletiert, und mit Stickstoff getrocknet. Zu der RNA wurden die einzelnen Komponenten für die in vitro Translation pipettiert:
2 µl H_2O, 0.5 µl Mg $(OAc)_2$ 32.5 mM, 2 µl K (OAc) 1M, 2 µl Translationscocktail, 8.5 µl L-(^{35}S)-Methionin und 10 µl Reticulocytenlysat (alles NEN). Die Lösungen wurden gut gemischt und durch eine kurze Zentrifugation am Boden des Gefäßes vereinigt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 60 Minuten; nach dieser Zeit hatte die Inkorporation der radioaktiven Vorstufen bereits das Plateau erreicht (Abb. 3).

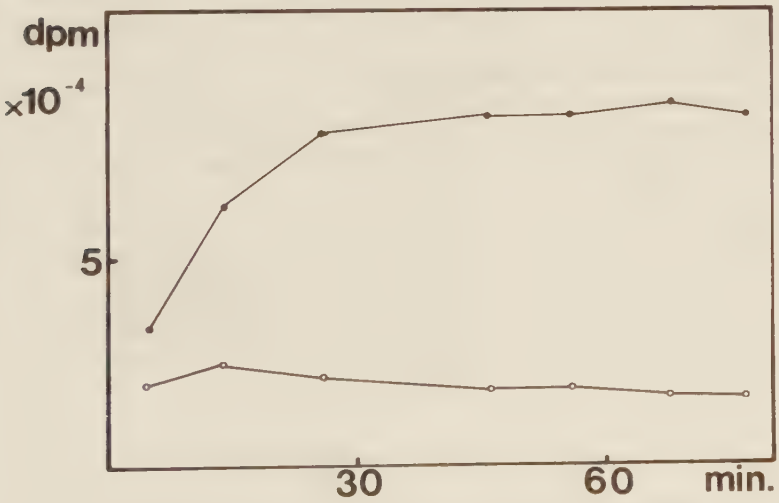


Abbildung 3: ^{35}S-Methionin Inkorporation in TCA fällbares Material im in vitro Translationssystem
•-•-• mit, o-o-o ohne externe poly(A)$^+$ RNA

Die Inkubation wurde abgebrochen, indem die Proben in Eis gestellt und mit 1 Volumen Proteinprobenpuffer versetzt wurden. Von diesem Gemisch wurden 2 µl zur quantitativen Analyse der Translation auf Filtrierpapier pipettiert, 10 Minuten in 10% TCA gekocht, mit Wasser, Alkohol und Aceton gewaschen, getrocknet und in 7 ml Instagel gegeben. Die Translationsaktivität (Stimulation über dem "background") wurde über den Quotienten cpm Probe/cpm Nullwert (keine externe RNA im Translationsansatz) bestimmt. Die Proben wurden dann 2 Minuten gekocht und 20 Minuten bei 13 000 rpm (Sorvall, HB-4 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt in einem SDS-Polyacrylamidgelgradienten elektrophoretisiert oder bei -30°C aufbewahrt. In vitro Translationen mit dem NEN ^{3}H-Leucin-Translation-Kit sind gar nicht oder nur sehr viel schlechter durchführbar, wenn Drosophila RNA eingesetzt wird. Dagegen laufen die Translationen mit der RNA aus Adenovirus-infizierten HeLa-Zellen in diesem System mit gleicher Effizienz wie im ^{35}S-Methionin-Translation-Kit.

Um die Anwendbarkeit des NEN-Translation-Kits auf Drosophila RNA zu überprüfen, wurde die RNA aus Drosophila Zellkulturen nach Hitzeschockbehandlung in vitro transliert (McKenzie et al., 1975).

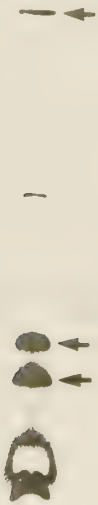


Abbildung 4: in vitro Translationsprodukte der Hitzeschock RNA. Die Pfeile markieren den Gelanfang und die niedermolekularen Hitzeschockproteine

Die hochmolekularen Hitzeschockproteine sind zwar nicht nachweisbar, was auf Degradation der RNA zurückzuführen sein kann, die beiden niedermolekularen Polypeptide werden jedoch gut transliert (Abb. 4). Neben den Proteinen, die von externer RNA codiert werden, tritt noch ein internes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 50 000 Dalton auf (Pi50), das auch dann synthetisiert wird, wenn keine externe RNA zugegeben wird. Dieses Polypeptid wird im Folgenden als Molekulargewichtsmarkierung verwendet, es muß aber auch von Proteinen unterschieden werden, die von externer RNA transliert werden.

10. Fällung von Tubulinen mit Vinblastin

Die Fällung von Tubulinen mit Vinblastin erfolgte in Anlehnung an Olmsted et al. (1970).
Die Organe wurden in Homogenisationspuffer (0.24M Saccharose, 0.01M Tris-HCl pH 7, 0.02M $MgCl_2$) gesammelt. Es wurde darauf geachtet, daß zwischen der Präparation und der Homogenisation nicht mehr als 15 Minuten lagen. Die Organe wurden möglichst trocken in einen 1 ml-Dounce-Homogenisator überführt und in 100 bis 200 µl Homogenisationspuffer mit sechs Stößen eines schwergängigen Pistills bei 4°C homogenisiert. Das Homogenat wurde in Polycarbonatröhrchen für 90 Minuten bei 150 000 g zentrifugiert (Beckman 75Ti-Rotor). Bei einer Materialmenge von ca. 25 Hoden wurde der Überstand mit 10 µl Vinblastin versetzt und 30 bis 90 Minuten bei 4°C gefällt. Die Tubuline wurden 30 Minuten bei 20 000 rpm und 4°C im JA 20-Rotor (Beckman) pelletiert. Zur Fällung in vitro translierter Tubuline wurde zum Translationsansatz ein Homogenat von ca. 20 Hoden gegeben, die als Carrier und Molekulargewichtsmarkierung dienten; Zentrifugation und Fällung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

11. In-situ Hybridisierung mit cDNA

11.1. Synthese von cDNA mit AMV Reverse Transcriptase

Die reverse Transcription wurde in Anlehnung an Rosen (1976) und

nach den Angaben von Herrn Prof. Beard durchgeführt, der auch das Enzym freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Lösungen:

Transcriptionspuffer:

50 mM Tris-HCl pH 8.3
40 mM KCl
6 mM $MgCl_2$
20 mM DTT
100 µg BSA/ml

Actinomycin-D-Lösung:

500 µg/ml Transcriptionspuffer

Primer-Lösung:

9 µg oligo(dT)/ml Transcriptionspuffer

Enzymlösung:

3 µl Reverse Transcriptase
10.5 µl Transcriptionspuffer ≙ 2 Units/µl

1 bis 10 µg gereinigte poly(A)-haltige RNA wurden in einem Eppendorfgefäß mindestens 15 Stunden gefällt. Die pelletierten Nukleinsäuren wurden dann etwa 60 Minuten im Vacuumschrank getrocknet und in 16.5 µl Primerlösung, 5 µl Transcriptionspuffer und 2.5 µl Actinomycin D-Lösung aufgenommen. Die Probe wurde dann in ein anderes Eppendorfgefäß überführt, in dem zuvor nacheinander 17 µl ≙ 8.5 µCi dATP, 30 µl ≙ 30.0 µCi dTTP, 14 µl ≙ 14.0 µCi dCTP und 12 µl ≙ 6.0 µCi dGTP eingedampft worden waren. Die Mengen der radioaktiven Triphosphate waren so gewählt, daß jedes in einer Endkonzentration von 25 µM vorlag. Zu der Probe wurde dann 1.5 µl Enzymlösung gegeben.
Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei 37°C und wurde durch Überführung der Probe in Eis abgebrochen.
Zur Trennung der synthetisierten cDNA von den freien Triphosphaten wurde die Probe über eine 8 x 0.6 cm Sephadex G 75-Säule gegeben und mit Transcriptionspuffer ohne DTT und BSA eluiert. Das Eluat wurde in 2-Tropfen-Fraktionen (≙ ca. 30 µl) aufgefangen, von denen

jeweils 2 µl zur Radioaktivitätsmessung in Instagel-Szintillationscocktail gegeben wurden. Die Fraktionen des Gelausschluß wurden an Hand der Radioaktivitätsverteilung bestimmt und vereinigt.
Zur Hydrolyse der RNA wurde die Probe auf eine Endkonzentration von 0.3M NaOH gebracht und 5 Minuten auf 80°C erhitzt; anschließend wurde mit HCl neutralisiert und die cDNA mit Äthanol gefällt. Um eine möglichst quantitative Fällung zu erreichen, wurde tRNA aus Hefe als Carrier zugegeben (Endkonzentration 1o µg/ml).

Um die Menge der synthetisierten cDNA abzuschätzen, wurde aus der Radioaktivität im Gelausschluß (Abb.5) und der durchschnittlichen spezifischen Aktivität der eingesetzten Desoxitriphosphate die Menge der revers transcribierten cDNA in µg berechnet.

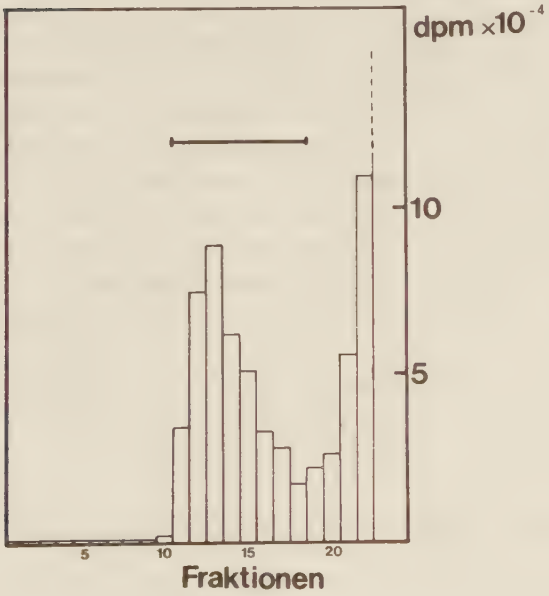


Abbildung 5:
Gelausschlußchromatographie von cDNA an Sephadex G 75. Der Balken markiert die Fraktionen des Gelausschlusses.

Es zeigte sich, daß bei der reversen Transcription die Ausbeute an cDNA knapp 10% der eingesetzten RNA betrug. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Befunden aus anderen Laboratorien (z.B. Lubsen, Sondermeijer, pers. Mitt.).

11.2. Herstellung von Präparaten für die in-situ Hybridisierung

11.2.1. Präparation von polytänen Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsen

Larven des späten 3. Larvenstadiums, die zur Verpuppung den Nährbrei verlassen hatten, wurden in 1% Natriumcitrat präpariert. Die Speicheldrüsen wurden paarweise in 20 µl 45% Essigsäure auf einen Chromschwefelsäure-gereinigten Objektträger überführt und mit einem silikonisierten 18 x 18 mm Deckglas abgedeckt. Durch leichtes Beklopfen mit einer kleinen Pinzette wurde zunächst das Gewebe gequetscht. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt, das Präparat mit einem Streifen Filterpapier bedeckt und mit einer großen Pinzette kräftig beklopft. Dadurch wurden die Kernmembranen zerstört und die Chromosomen gespreitet. Um möglichst flache Quetschungen und damit morphologisch einwandfreie Präparate zu erzielen, wurde dann eine Stahlwalze vorsichtig über das Objekt gerollt.
Der Objektträger wurde durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren, das Deckglas mit einer Apolloklinge abgesprengt und das Präparat sofort für 5 Minuten in ein Alkohol-Eisessiggemisch (3 : 1) überführt. Anschließend wurde für weitere 5 Minuten in 96% Äthanol gewaschen.
Die Präparate wurden luftgetrocknet, mikroskopisch kontrolliert und bis zur weiteren Verarbeitung staubfrei aufbewahrt.

11.2.2. Präparation von Kernen primärer Spermatocyten aus larvalen Hodenanlagen

Hodenanlagen aus Larven des späten 3. Larvenstadiums wurden

in Drosophilaringer präpariert. Die Hodenanlagen wurden paarweise in 10 µl Ringer auf einen Objektträger überführt und mit einem in HCl ausgekochten, silikonisierten Deckglas abgedeckt. Das Präparat wurde leicht mit einem Bleistift beklopft, anschließend wurde ein Streifen Filterpapier aufgelegt, mit vorsichtigem Daumendruck gequetscht und dabei gleichzeitig der überschüssige Ringer abgesaugt. Durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurde das Präparat gefroren, dann das Deckglas mit einer Apolloklinge abgesprengt und der Objektträger sofort in 96% Äthanol getaucht. Zur weiteren Verarbeitung wurden nur Präparate verwendet, die freiliegende, gut gequetschte und nicht geschrumpfte Kerne enthielten.
Die Präparate wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung staubfrei aufbewahrt.

11.3. In-situ Hybridisierung von cDNA auf die RNA in Spermatocytenkernen und die DNA in polytänen Chromosomen

Die pelletierte und im Vacuumschrank getrocknete cDNA wurde in einer Lösung aus 4x SSC und 50% Formamid (1x SSC = 0.15M NaCl, 0.015M Natriumcitrat, pH 7; über Milliporefilter gereinigt) aufgenommen. Die Radioaktivität der Probe wurde über ein Aliquot bestimmt.
Um unspezifische Hybridisierung weitgehend auszuschalten, wurde der cDNA-Lösung ein etwa 2 000facher Überschuß an kalter DNA aus Kalbsthymus (Serva) zugegeben. Diese DNA wurde in 0.1M NaOH aufgenommen und 5 Minuten bei 80°C denaturiert, anschließend mit HCl neutralisiert und für eine Stunde bei -30°C mit Äthanol gefällt. Die pelletierte DNA wurde dann in 4x SSC, 50% Formamid aufgenommen und in der entsprechenden Menge zu der cDNA-Lösung gegeben.
Für die Hybridisierung der cDNA auf chromosomale DNA von polytänen Chromosomen wurden die Präparate einer RNase-Behandlung unterzogen (50 µl RNase A; 100 µg/ml 2x SSC). Das Präparat wurde mit einem 18 x 18 mm Deckglas (in HCl ausgekocht und silikonisiert) abgedeckt und eine Stunde bei 37°C in einer 2x SSC-feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde das Deckglas in 2x SSC abgeschwemmt und das Objekt dreimal in 2x SSC, zweimal in 70% Äthanol, zweimal in 96% Äthanol gewaschen und luftgetrocknet.

Die DNA der polytänen Chromosomen wurde 3 Minuten bei Zimmertemperatur in 0.07M NaOH denaturiert und das Präparat dann wieder je zweimal in 70% und 96% Äthanol gewaschen. (In Anlehnung an Pardue et al., 1975.)

Für die Hybridisierung von cDNA auf die RNA in Spermatocytenkernen wurde die Methode von Pukkila (1975) leicht verändert. Durch eine vorsichtige Behandlung mit Proteinase K sollte die Kernmembran leicht angedaut und ein besseres Eindringen der cDNA ermöglicht werden. Auf jedes Präparat wurden 25 µl Proteinase K-Lösung (0.5 µg/ml 0.05M Tris-HCl pH 7.4, 0.001% SDS) gegeben, ein Deckglas aufgelegt und 15 Sekunden inkubiert. Das Deckglas wurde dann in 2x SSC abgeschwemmt und das Präparat in 70% und 96% Äthanol gewaschen. Zur in-situ Hybridisierung wurden auf jedes Präparat in einem Volumen von 20 µl zwischen 4×10^6 und 2×10^5 dpm ^{3}H-cDNA gegeben und mit einem 18 x 18 mm Deckglas abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in einer verschließbaren Kunststoffwanne, die mit 20x SSC-feuchtem Filterpapier ausgelegt war. Diese SSC-Konzentration wird von Old (1977) und Pukkila (1975) empfohlen, um eine Verdünnung der Salzkonzentration auf dem Objektträger durch kondensierenden Wasserdampf zu verringern. Nach einer Inkubationszeit von 62h bei 37°C wurden die Präparate wie folgt gewaschen (Hennen et al., 1975):
dreimal 2x SSC Zimmertemperatur, dreimal 2x SSC 60°C, zweimal 2x SSC Zimmertemperatur, einmal 5% TCA 4°C, dreimal 70% Äthanol Zimmertemperatur und zweimal 96% Äthanol Zimmertemperatur.
Die luftgetrockneten Präparate wurden ca. 10 Sekunden in Kodak NTB-2 Emulsion (1:1 mit H_2O verdünnt, 45°C) getaucht und bei Zimmertemperatur für etwa 2h getrocknet. Die Exposition erfolgte in einem lichtdichten Behälter bei 4°C für die im Experiment angegebenen Zeiten.
Die Präparate wurden in Kodak D 19 Entwickler (1:1 mit Wasser verdünnt) 1.5 Minuten entwickelt, 30 Sekunden gewässert, 15 Minuten in Agfa Acidofix fixiert und 15 Minuten gewässert.
Die Spermatocytenkernpräparate wurden nach der Methode von Glätzer (pers.Mitt.) in einer Lösung aus 49 ml Natriumacetatpuffer (0.465 M Natriumacetat; 0.024 M Essigsäure; pH 2.8 mit HCl) und 1 ml Eosinlösung

(0.1 g Eosin, wasserlöslich, 40 ml Glycerin, 40 ml Methanol) für 3 bis 4h gefärbt. Anschließend wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Euparal eingedeckt.

Um zu überprüfen, ob eine in-situ Hybridisierung auf die RNA in Spermatocytenkernen möglich ist, wurde cDNA zu käuflichem poly(A)

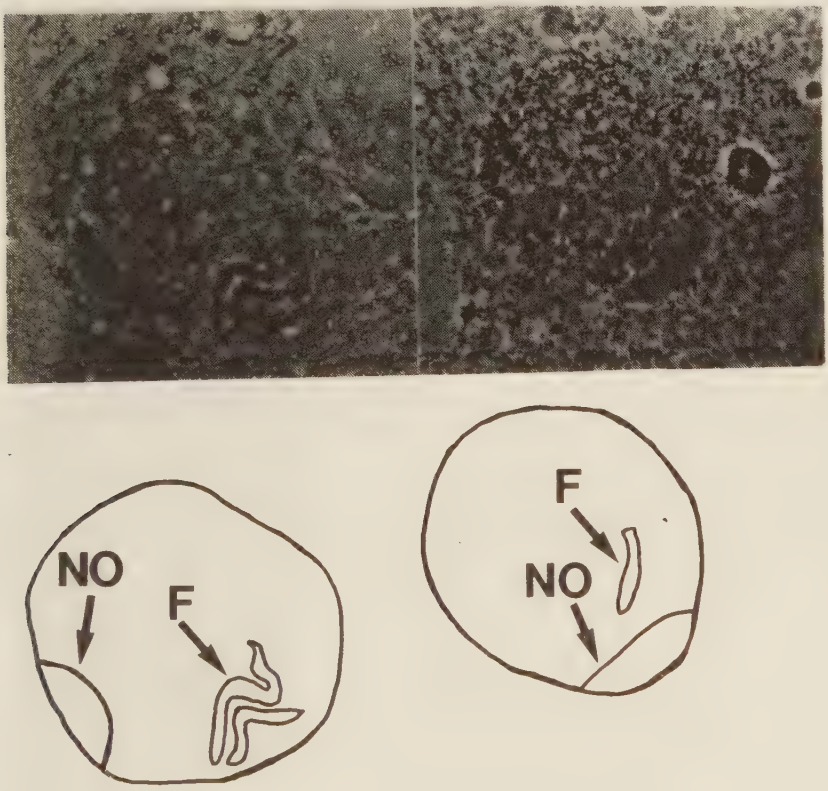


Abbildung 6: In-situ Hybridisierung von "poly(A)-cDNA" auf die RNA in primären Spermatocytenkernen. In dem Schema sind die Fäden (F) und der Nukleolus (NO) eingezeichnet.

(Boehringer) hergestellt und in-situ auf die RNA in Kernen primärer Spermatocyten hybridisiert. Bei einer spezifischen Hybridisierung wäre eine starke Markierung über den Kernen zu erwarten, weil hier eine Anreicherung poly(A)-haltiger RNA auf kleinem Raum vorliegt (Knust, 1979); der Nukleolus sollte unmarkiert bleiben.
Die Hybridisierung erfolgte wie erwartet: die Anreicherung von Radioaktivität in den Kernen und die Aussparung des Nukleolus zeigen, daß die Markierung nicht zufällig sondern spezifisch ist (Abb. 6).

Bemerkenswert ist, daß in den stark geschwärzten Kernen kaum Silberkörner über den Fäden (F) zu finden sind.

III. Ergebnisse

1. Vergleich der in vivo synthetisierten Proteine aus Männchen mit vollständiger oder partiellen Y-Defizienz und aus X/Y Männchen

Bei der Auftrennung von Gesamtproteinextrakten aus larvalen Hodenanlagen von X/Y Tieren, X/O Tieren und partiell Y-defizienten Tieren mit den genetischen Konstitutionen $X/A.Y^{PF}$ und $X/^{S.KT}Y\text{-}A$, können weder von der Anfärbbarkeit noch vom Vergleich der in Proteine eingebauten Radioaktivität signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen gefunden werden (Kloetzel, 1976).
In Proteinextrakten aus den Hoden der adulten Tiere sind jedoch große Unterschiede, besonders im Bereich von 52 000 Dalton (P52) zu beobachten (Kloetzel, Glätzer, pers. Mitt.)
Vergleicht man die anfärbbaren Proteine aus adulten Hoden der vier Genotypen, so ist die verminderte Synthese der P52 Proteine besonders deutlich in den $X/A.Y^{PF}$ und den X/O Tieren (ohne Abb.).

Abbildung 7: Proteine aus adulten Hoden nach einer radioaktiven Markierung von 20h. Fluorographie nach Auftrennung in einem 9 - 20%igen SDS-Polyacrylamidgelgradienten.
1. Proteine aus X/O Tieren,
2. Proteine aus X/Y Tieren
Der Pfeil markiert den 52 000 Dalton Bereich.

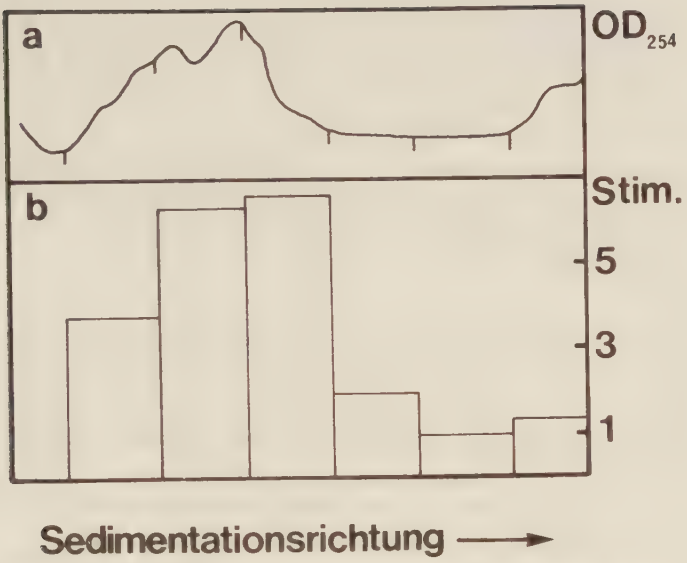
Die in vivo synthetisierten Proteine aus X/Y und X/O Hoden nach einer radioaktiven Markierung von 20h weisen bereits deutliche Unterschiede im 52 000 Dalton Bereich auf (Abb. 7).
Weil in postmeiotischen Zellen keine nachweisbare RNA-Synthese mehr stattfindet (Hennig, 1967; Lassak, 1979), muß die mRNA für die 52 000 Dalton Proteine bereits in früheren Stadien synthetisiert worden sein.
In den folgenden Experimenten wurde deshalb versucht, vor allem aus larvalen Hodenanlagen mRNA-Fraktionen zu isolieren, in denen P52 mRNA angereichert ist.

2. In vitro Translationen

2.1. Translation von Gesamt-poly(A)$^+$-RNA aus larvalen Hodenanlagen

In diesem Experiment wurde die poly(A)$^+$-RNA aus larvalen Hodenanlagen in einem Saccharosegradienten mit dem Ziel aufgetrennt, die P52 mRNA in einer bestimmten S-Wert-Klasse anzureichern.
Die heterogen verteilte RNA wurde in sechs S-Wert-Klassen fraktioniert und in vitro transliert.
Dabei zeigte sich, daß wesentliche Mengen an mRNA nur zwischen 15 und 22 S vorliegen (Fraktionen 2 und 3). Erwartungsgemäß haben die in vitro Translationsprodukte der RNA mit höherem S-Wert im Durchschnitt auch höhere Molekulargewichte. P52 mRNA ist in beiden Fraktionen enthalten, in Fraktion 3 jedoch geringfügig angereichert (Abb. 8).

Abbildung 8: a) Absorptionsprofil (OD_{254}) der poly(A)$^+$-RNA larvaler Hodenanlagen (Auftrennung in einem 5 - 40%igen Saccharosegradienten),
b) Stimulationsraten der einzelnen RNA-Fraktionen im in-vitro Translationssystem,
c) in vitro Translationsprodukte der einzelnen RNA-Fraktionen (Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgelgradienten), die Pfeile markieren die Position der P52 Proteine.


a
OD254
b
Stim.
5
3
1
Sedimentationsrichtung

c
1
2
3
4
5
6

Die Proteingruppe wird im Vergleich zu anderen in auffällig großen Mengen synthetisiert; das ist vor allem bemerkenswert, wenn man bedenkt, daß sie in-vivo in larvalen Hodenanlagen keineswegs zu den besonders stark vertretenen Proteinen gehört, sondern mengenmäßig im Durchschnitt oder eher darunter liegt.

Eine Auftrennung in mRNA-Fraktionen mit wenigen verschiedenen Molekülen, die sich für eine weitere Reinigung der P52 mRNA anbietet, scheint mit dieser Methode jedoch nicht möglich zu sein.

2.2. Translation der RNA aus Fraktionen der Polysomenisolierung

Um mRNA aus freien RNPs und Polysomen-assoziierten RNPs zu unterscheiden, wurden freie und membrangebundene Polysomen zusammen isoliert und in einem Saccharosegradienten von RNPs mit kleineren S--Werten abgetrennt (Abb. 9). Das Schema zeigt die bei der Polysomenisolierung anfallenden Fraktionen:

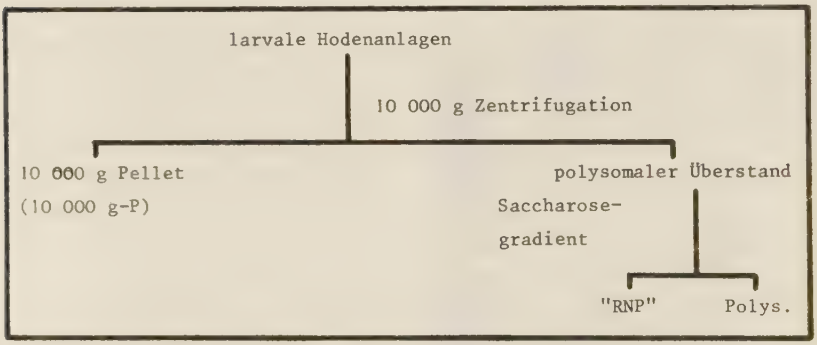


Tabelle 1:

Fraktion	Translationsaktivität (Stimulation über dem "background")
Polys.	5 X
"RNP"	2 X
10 000 g-P	1.5X

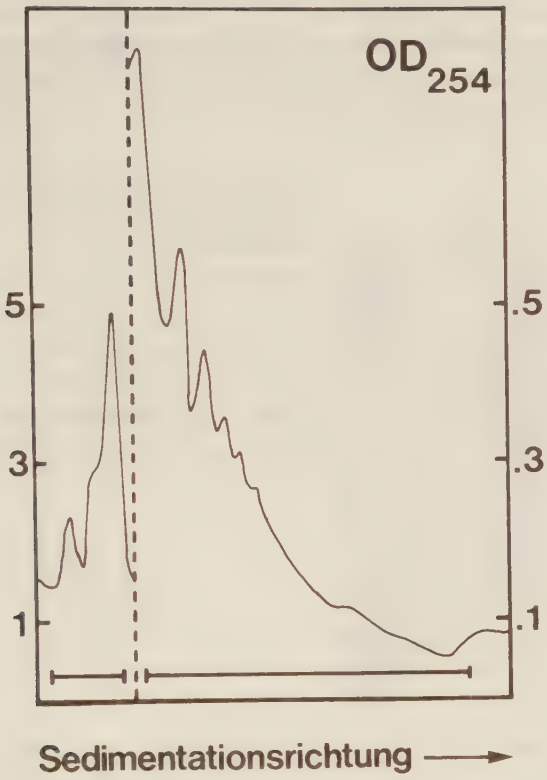


Abbildung 9: Absorptionsprofil (OD_{254}) des polysomalen Überstandes, (Auftrennung in einem 15 - 45%igen Saccharosegradienten; die Balken markieren die Fraktionen, die als "RNP" und Polysomen zusammengefaßt wurden.

Wie erwartet, zeigt die polysomale poly(A)$^+$-RNA die stärkste Aktivität im in vitro System (Tabelle 1) und von ihr wird auch der Großteil der Proteine transliert (Abb. 10a). Die poly(A)$^+$-RNA aus den beiden anderen Fraktionen führt zu wesentlich geringeren Stimula-

tionen: in der "RNP"-Fraktion ist ein Messenger für ein 58 000 Dalton Protein enthalten (ohne Abb.), und die poly(A)$^+$-RNA der 10 000 g-P-Fraktion dirigiert in vitro die Synthese von drei Proteingruppen mit Molekulargewichten von 29 000, 39 000 und 52 000 Dalton (Abb. 10b).

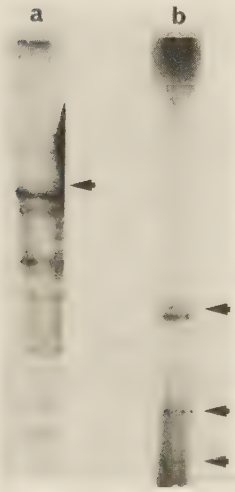


Abbildung 10: In vitro Translationsprodukte (Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgelgradienten)
a) von polysomaler poly(A)$^+$-RNA (der Pfeil markiert die Position der P52 Proteine)
b) von der poly(A)$^+$-RNA des 10 000 g-P (die Pfeile markieren die Position von Proteinen mit Molekulargewichten von 52 000, 39 000 und 29 000 Dalton)

In dieser Fraktion ist also die mRNA für ein 52 000 Dalton Protein angereichert. Geht man davon aus, daß dieses Polypeptid mit dem P52 Protein identisch ist, das von der polysomalen mRNA transliert wird (Abb. 10a), so muß man annehmen, daß die mRNA dafür in zwei verschiedenen Zustandsformen vorkommt und deshalb in zwei verschiedenen Fraktionen isoliert wird.

2.3. Translation der RNA aus Fraktionen der Kernisolierung

Weil in der 10 000 g-P-Fraktion mit großer Wahrscheinlichkeit Zellkerne oder Kernfragmente enthalten sind, kann nicht entschieden werden, ob die in vitro Translationsprodukte dieser Fraktion von cytoplasmatischer oder von nukleärer RNA dirigiert werden.

Deshalb wurden die in vitro Translationsprodukte untersucht, die von Kern-RNA, cytoplasmatischer RNA und der RNA des cytoplasmatischen 10 000 g-P dirigiert werden. Durch dieses Experiment sollte klargestellt werden, ob die nicht-polysomale P52 mRNA in den Spermatocytenkernen oder im Cytoplasma lokalisiert ist.
Das Schema zeigt die Isolierungsschritte und die einzelnen Fraktionen, die in vitro transliert wurden:

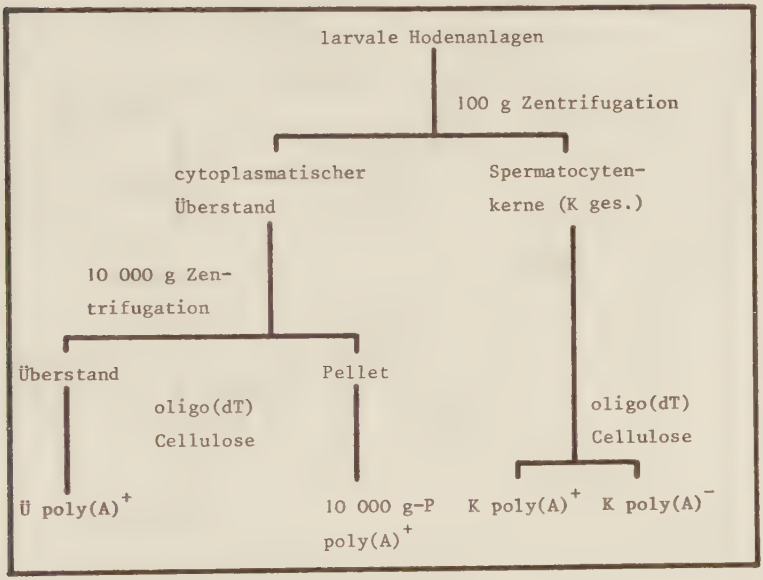


Tabelle 2:

Fraktion	Translationsaktivität (Stimulation über dem "background")
Ü poly(A)$^+$	1 X
10 000 g-P poly(A)$^+$	2 X
K ges.	3.2 X$^{+)}$
K poly(A)$^+$	2.3 X
K poly(A)$^-$	4 X

$^{+)}$ Während bei den anderen Translationen die RNA-Fraktionen aus einer Charge von Hodenanlagen eingesetzt wurden, wurde die RNA für diese Translation aus einer gesonderten Charge isoliert.

Die geringe Translationsaktivität der RNA des cytoplasmatischen Überstandes (Tabelle 2) ist wahrscheinlich durch Degradation zu erklären: im Gegensatz zur Polysomenisolierung wurden hier keine RNase-Inhibitoren zugegeben, und polysomale mRNAs werden besonders schnell von Nukleasen angegriffen.

Weiterhin fällt auf, daß die poly(A)$^-$-RNA der Spermatocytenkerne eine wesentlich höhere Translationsaktivität hat als die poly(A)$^+$-RNA aus der selben Fraktion.

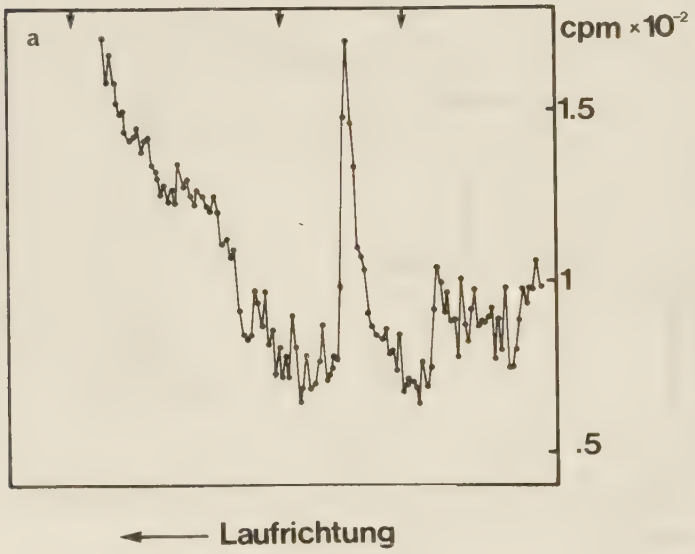


Abbildung 11: In vitro Translationsprodukte (Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgelgradienten)

a) der Gesamt-RNA aus Spermatocytenkernen

b) der poly(A)$^-$-RNA aus Spermatocytenkernen.

Die Pfeile markieren die Position der Molekulargewichtsmarker (39 000, 68 000 und 160 000 Dalton)

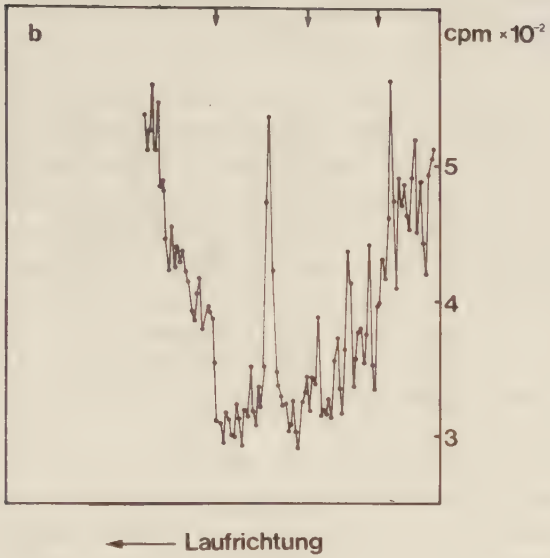


Abbildung 11b

Die Kern-RNA (Abb. 11a),und davon besonders die poly(A)$^-$-RNA, (Abb. 11b) dirigiert in vitro hauptsächlich die Synthese hochmolekularer Proteine. In beiden Fraktionen werden jedoch keine erkennbaren Mengen der Proteine synthetisiert, die für die RNA des 10 ooo g-P charakteristisch sind (52 000, 39 000 und 29 000 Dalton). Die 10 000 g-P-RNA, die nach der Kernisolierung gewonnen wurde, dirigiert in vitro die Synthese der gleichen Proteine, wie die in Kap. 2.2. beschriebene 10 000 g-P-RNA.

Mit diesen Experimenten ist sichergestellt, daß die RNA des 10 000 g--P, die für die drei Proteingruppen codiert, cytoplasmatischer Herkunft ist.
Für die folgenden Experimente wurde die 10 000 g-P-RNA stets nach Abtrennung der Spermatocytenkerne isoliert, um eine mögliche Verunreinigung durch nicht translierbare Kern-RNA zu vermeiden.

2.4. Translation der 10 000 g-P-RNA aus larvalen Hodenanlagen der Genotypen X/Y und X/0

Weil die Masse der in vivo synthetisierten Proteine larvaler Hodenanlagen aus X/Y Tieren sich nicht signifikant von den Proteinen aus den Hodenanlagen von X/0 Tieren unterscheidet, ist anzunehmen, daß ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede in der polysomalen RNA der beiden Genotypen vorliegen. Die RNA des 10 000 g-P ist jedoch nicht an Polysomen assoziiert; es besteht deshalb die Möglichkeit, daß diese RNA für die Unterschiede im Proteinmuster zwischen den adulten Hoden steriler und fertiler Tiere verantwortlich ist.
Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die 10 000 g-P-RNA aus der gleichen Anzahl Hodenanlagen aus X/Y und X/0 Tieren in vitro translatiert.
Dabei zeigt sich, daß die in vitro Translationsprodukte dieser RNA--Fraktion aus den Y-defizienten Tieren keine nachweisbaren Mengen an P52 Protein enthalten (Abb. 12). Das heißt, daß die mRNA für diese Proteingruppe entweder gar nicht oder in einer geringeren Menge oder in einer nicht translierbaren Form vorhanden ist.

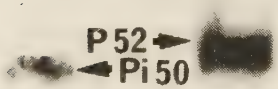


Abbildung 12: In-vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P-poly(A)$^+$-RNA im 52 000 Dalton Bereich; links aus X/Y, rechts aus X/0 Hodenanlagen. (Pi50 = internes Protein des Translationssystems)

Wenn die P52 mRNA in den Hodenanlagen der X/0 Tiere vermindert vorkommt, so müßte sie durch den Einsatz größerer RNA-Mengen an Hand der Translationsprodukte nachweisbar sein. Das Experiment wurde deshalb mit 6 µg 10 000 g-P-poly(A)$^+$-RNA aus X/0 und, zum Vergleich, 2 µg 10 000 g-P-poly(A)$^+$-RNA aus X/Y Hodenanlagen wiederholt.
Trotz der dreifachen Menge an RNA ist im in vitro Translationssystem nur knapp der doppelte Einbau an Radioaktivität im Vergleich zu der X/Y Probe zu erreichen. Bei der Auftrennung der Translationsprodukte im SDS-Gel wurde X/Y und X/0 Material im Verhältnis 1 : 1.8 (bezogen auf die eingebaute Radioaktivität) eingesetzt.

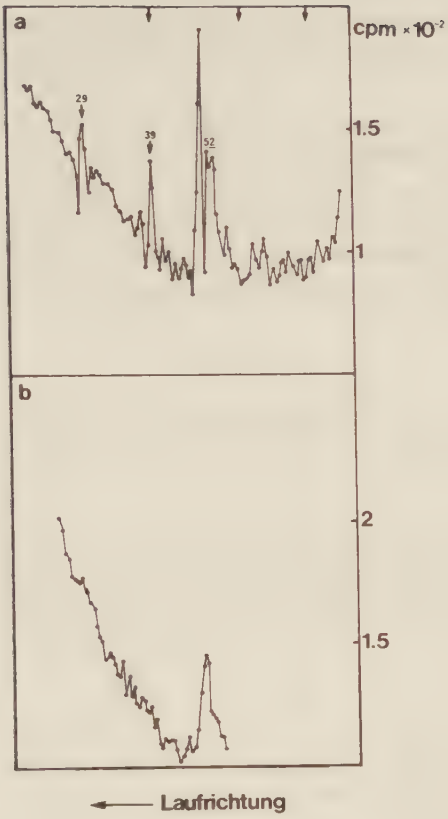


Abbildung 13: In vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P-poly(A)$^+$-RNA (Auftrennung im SDS-Gel)
a) aus X/Y,
b) aus X/O Hodenanlagen
(Die Pfeile geben die Position der Molekulargewichtsmarker an.)

Während in der X/Y Probe wieder die drei charakteristischen Proteingruppen als die wesentlichen Komponenten auftreten, sind sie in der X/O Probe nicht zu erkennen (Abb. 13).

Das Experiment zeigt, daß sich die beiden RNA-Fraktionen sehr deutlich von einander unterscheiden, es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, daß geringe Mengen der translierbaren mRNA auch in der Fraktion aus den X/O Hodenanlagen vorliegen.

3. Charakterisierung der in vivo synthetisierten Proteine im 52 000 Dalton Bereich

Zu den Proteinen, die wesentlich an Zellteilungsmechanismen und an der Spermatidenentwicklung beteiligt sind, gehören die Tubuline. Mikrotubuli konnten elektronenmikroskopisch (Glätzer, pers. Mitt.) und mit Immuntechniken (Rungger-Brändle, 1977) in großen Mengen in den Hoden von Drosophila nachgewiesen werden. Deshalb lag es nahe, die 52 000 Dalton Proteine mit den Tubulinen, die ein ähnliches Molekulargewicht haben, zu vergleichen.

3.1. Coelektrophorese von Tubulin und Proteinen aus adulten Hoden im SDS-Polyacrylamidgel

Ein Gesamtproteinextrakt aus adulten Hoden und gereinigtes Tubulin aus Hühnerhirn (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. G. Hiller, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) wurden zusammen in einem SDS-Polyacrylamidgelgradienten aufgetrennt (Abb. 14).

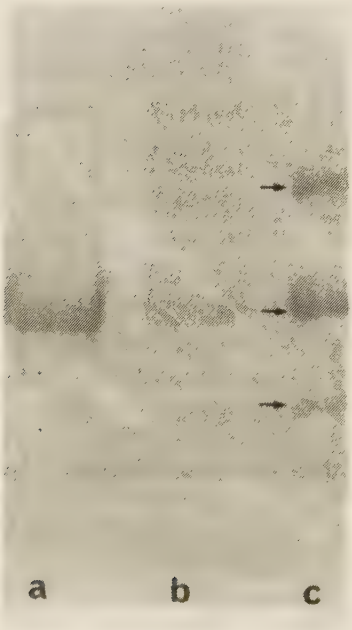


Abbildung 14: Coelektrophorese der Proteine aus adulten Hoden mit Tubulin.
a) Gesamtproteinextrakt aus adulten Hoden und gereinigtes Tubulin,
b) gleiche Menge des Gesamtproteinextraktes ohne Zugabe von Tubulin,
c) Eichproteine: BSA (68 000 Dalton), Tubulin (52 000 Dalton), Actin (44 000 Dalton)

Das identische Wanderungsverhalten der Tubuline und der Proteine im 52 000 Dalton Bereich läßt vermuten, daß diese Proteingruppe zumindest teilweise aus Tubulinen besteht.

3.2. Zweidimensionale Elektrophorese der 52 000 Dalton Proteine

Um weitere Ähnlichkeiten zwischen den Tubulinen und den 52 000 Dalton Proteinen zu finden, wurde ein Gesamtproteinextrakt wie in Kap. 8.3. beschrieben zweidimensional elektrophoretisiert.

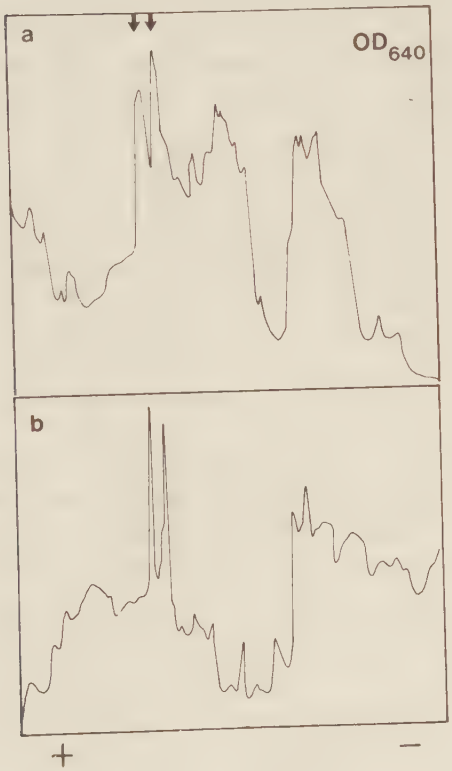


Abbildung 15: Isoelektrofocussierung
a) von gereinigtem Tubulin
b) der 52 000 Dalton Proteine aus adulten Hoden
(Die Pfeile markieren die Position der Tubuline.)

Parallel dazu wurde gereinigtes Tubulin isoelektrofocussiert (Abb.15).

Ein großer Teil der in vivo synthetisierten P52 Proteine stimmt also sowohl im Molekulargewicht als auch im isoelektrischen Punkt mit den Tubulinen überein.

3.3. Fällung der Tubuline mit Vinblastin

Ähnlich wie mit Colchizin können Tubuline mit Vinblastin gefällt werden (Olmsted, 1970).
Im Gegensatz zu Ergebnissen aus anderen Laboratorien (z.B. Wilson, 1970) scheint die Fällung der Drosophila-Tubuline aus Hoden unter den verwendeten Bedingungen sehr spezifisch zu sein. Neben den Tubulinen treten im SDS-Gel als anfärbbare Komponenten nur noch eine schwache Bande bei 70 000 Dalton und ein oder zwei zusätzliche Banden im Tubulinbereich auf (ohne Abb.).
Bei der Isoelektrofocussierung im pH-Bereich von 3.5 bis 10 sind abgesehen von einigen sehr schwach markierten Polypeptiden keine radioaktiv markierten Proteine außer den Tubulinen vorhanden. Besonders die von Hiller (pers. Mitt.) und Wilson (1970) beobachtete fast quantitative Präzipitation von Actin mit Hilfe von Vinblastin kann aufgrund dieser Befunde mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Weiterhin läßt eine Coelektrophorese mit Actin deutlich erkennen, daß in diesem Molekulargewichtsbereich kein anfärbbares Protein im Vinblastin-fällbaren Material enthalten ist.
Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die Tubulin-assoziierten Tau--Proteine (Herzog et al., 1978) ebenfalls mit Vinblastin gefällt werden. Diese Proteine haben Molekulargewichte von 70 000 und ca 55 000 Dalton und stimmen damit recht gut mit den oben beschriebenen Banden im SDS-Gel überein.

3.3.1. Vergleich des Vinblastin-fällbaren Materials aus X/Y und X/O Hoden im SDS-Gel

Aus einem Gesamtproteinextrakt aus adulten Drosophilahoden lassen sich mit Vinblastin im Wesentlichen zwei Polypeptide fällen, die mit der relativ breit laufenden 52 000 Dalton Proteingruppe comigrieren.

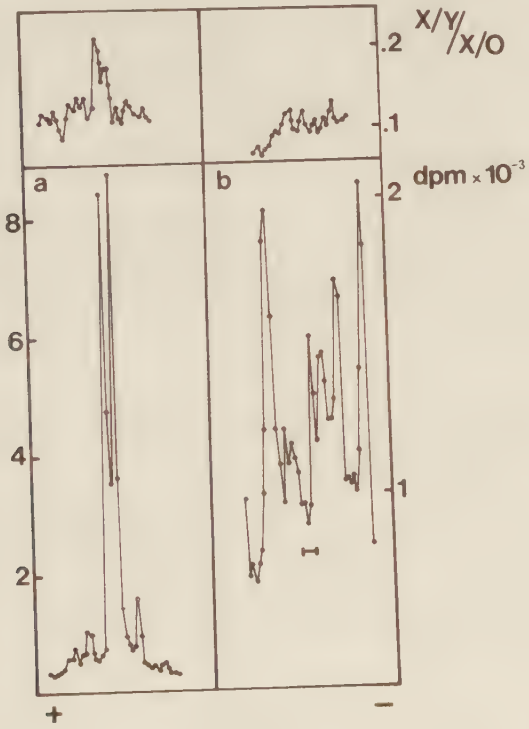


Abbildung 16: Vergleich der 52 000 Dalton Proteine aus adulten Hoden von X/Y und X/O Tieren. (Auftrennung im SDS-Gel)
a) Vinblastin-fällbares Material,
b) nicht mit Vinblastin fällbares Material (Überstand), der Balken markiert die Position der Tubuline.

Um festzustellen, ob die Unterschiede im 52 000 Dalton Bereich zwischen X/Y und X/O Tieren ganz oder teilweise auf eine unterschiedliche Tubulinsynthese zurückzuführen sind, wurden die Proteine aus ^{3}H-Leucin markierten X/O Hoden und aus ^{14}C-Leucin markierten X/Y Hoden gemeinsam extrahiert. Die Tubuline wurden aus diesem Extrakt mit Vinblastin gefällt und sowohl das Präzipitat als auch der Überstand in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 16).
Eine verminderte Synthese von 52 000 Dalton Proteinen in den Y-defizienten Tieren, die durch C/T-Peaks zu Gunsten der X/Y-Probe angezeigt wird, ist nur im Vinblastin-fällbaren Material, nicht aber im Überstand nachweisbar.
Ein Vergleich der Proteine aus X/Y und X/A.Y^{PF} Hoden führt zu dem gleichen Ergebnis.
Daraus ist zu schließen, daß es sich bei den 52 000 Dalton Proteinen, die in den Hoden von X/O und X/A.Y^{PF} Tieren vermindert synthetisiert werden, ausschließlich um Tubuline oder Tubulin-assoziierte Proteine handelt.

3.3.2. Vergleich des Vinblastin-fällbaren Materials aus X/Y und X/O Hoden durch Isoelektrofocussierung

Die Proteinproben wurden wie in Kap. 3.3.1. beschrieben radioaktiv markiert und isoliert und dann nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Von den einzelnen Fraktionen wurden zuvor Aliquots entnommen und die C/T-Verhältnisse dafür berechnet (Tabelle 3).

Tabelle 3:

Fraktion	^{14}C/^{3}H-Verhältnis
Gesamthomogenat	0.1232
Überstand	0.1227
Vinblastin-fällbares Material	0.1323

Die C/T-Verhältnisse, bei denen ein hoher Wert wiederum eine relative Anreicherung des Materials aus den X/Y Hoden bedeutet, zeigen bereits, daß im Vinblastin-fällbaren Material verhältnismäßig mehr Radioaktivität aus den X/Y Hoden enthalten ist. Das heißt, daß in den Hoden aus X/Y Tieren eine Anreicherung von Vinblastin-fällbarem Material im Vergleich zu Hoden aus X/O Tieren vorliegt.

Abbildung 17: Vergleich der Proteine aus adulten Hoden der Genotypen X/Y und X/O. (Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt) a) Vinblastin-fällbares Material, b) nicht mit Vinblastin fällbares Material. ●-●-● C/T-Verhältnis des fällbaren, o-o-o des nicht fällbaren Materials.

Bei der Isoelektrofocussierung (Abb. 17) fällt auf, daß die C/T-Unterschiede in den Tubulinen nicht so stark sind wie bei der SDS-Gelelektrophorese. Das kann zum Teil dadurch erklärt werden, daß Polypeptide, die im SDS-Gel im 52 000 Dalton Bereich laufen und dort zum C/T-Unterschied beitragen, hier über das Gel verteilt sind. Die C/T-Verhältniskurve des Überstandes zeigt, daß hier wiederum keine Unterschiede vorliegen.
C/T-Unterschiede in den gefällten Proteinen treten vor allem in der basischen Schulter der β-Untereinheit (1) auf, im Peak zwischen den beiden Tubulin-Hauptbanden (2) und in einigen weniger stark markierten Komponenten, von denen besonders die Polypeptide (3) und (4) reproduzierbar auftreten. Ein Teil dieser Nicht-Tubulin-Proteine hat den selben isoelektrischen Punkt wie Polypeptide, die bei einer zweidimensionalen Elektrophorese aus dem 52 000 Dalton Bereich isoliert werden (Abb. 19).

Die C/T-Verhältniskurve beim Vergleich des Vinblastin-fällbaren Materials aus X/Y und X/A.Y^{PF} Hoden ist weitgehend identisch mit der hier gezeigten C/T-Verhältniskurve: die deutlichsten C/T-Peaks treten in den Positionen (1) bis (4) auf.

Die Ergebnisse zeigen, daß in den Hoden der beiden untersuchten sterilen Mutanten Tubuline und Vinblastin-fällbare Nicht-Tubulin-Proteine vermindert synthetisiert werden. Die C/T-Unterschiede liegen nicht in den Tubulin-Hauptbanden sondern in Schultern davon, so daß man annehmen kann, daß beide Tubulin-Peaks aus mehreren Komponenten bestehen.

3.3.3. Vergleich des Vinblastin-fällbaren Materials aus larvalen Hodenanlagen und aus adulten Hoden

Die Beobachtung, daß C/T-Unterschiede häufig nicht in den Tubulinpeaks sondern in Schultern davon auftreten (Abb. 17, Abb. 21), gibt zu der Vermutung Anlaß, daß in den Peaks mehrere Polypeptide enthalten sind und die C/T-Unterschiede Tubuline betreffen, die zwar nur in geringeren Mengen synthetisiert werden, möglicherweise aber für das

entsprechende Entwicklungsstadium eine große Bedeutung haben. Eine solche Heterogenität der Tubuline, die an der Grenze des Auflösungsvermögens der SDS-Gele und der Isoelektrofocussierung liegt, kann durch das Auftreten verschiedener stadien- oder organellspezifischer Tubuline erklärt werden (Bibring et al., 1976).

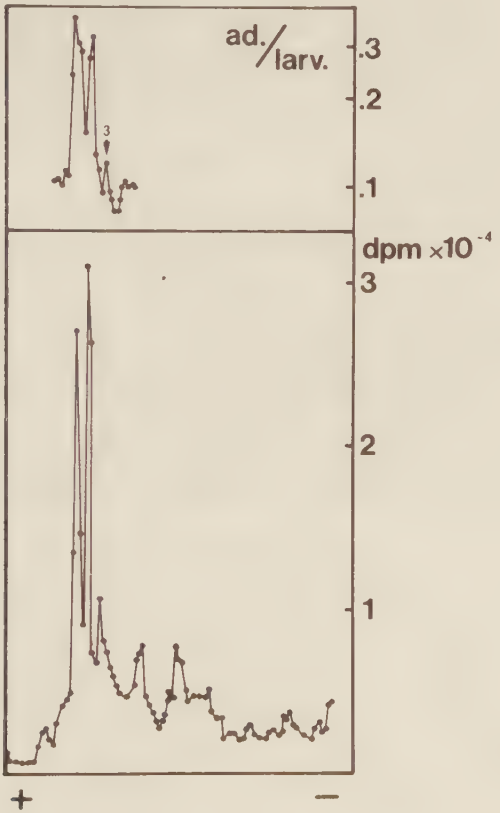


Abbildung 18: Vergleich des Vinblastin-fällbaren Materials aus larvalen Hodenanlagen und aus adulten Hoden. (Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt) In der Radioaktivitätskurve ist das Material aus den larvalen Hodenanlagen dargestellt.

Um sicherzustellen, daß Tubulinheterogenitäten in Drosophila vorliegen, wurde das Vinblastin-fällbare Material aus larvalen Hodenanlagen und aus adulten Hoden verglichen. Diese beiden Organe sollten sich, wenn Heterogenitäten vorliegen, in ihren Tubulinpopulationen deutlich unterscheiden:
während in den larvalen Hodenanlagen hauptsächlich die Tubuline des mitotischen und des meiotischen Spindelapparates vorkommen sollten, müssen in den adulten Hoden zusätzlich die Tubuline der Spermienflagellen und solche, die für die Spermatidenstreckung verantwortlich sind, vorhanden sein.
Der Vergleich der Tubuline aus den beiden Organen (Abb. 18) führt zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Tubuline sind in den adulten Hoden angereichert.
2. Die Maxima der Radioaktivitätspeaks der larvalen Tubuline decken sich nicht mit denen der adulten Tubuline.
3. Die Radioaktivitätspeaks sind symmetrisch, während die C/T-Peaks deutliche Schultern aufweisen.
4. Die Maxima der C/T-Peaks decken sich nicht mit den Maxima der Radioaktivitätspeaks.
5. Es tritt ein C/T-Peak (3) zu Gunsten der adulten Hoden auf, der bei dem selben isoelektrischen Punkt liegt wie der C/T-Peak (3) in Abb. 17.

Das Experiment zeigt, daß in larvalen Hodenanlagen und in adulten Hoden unterscheidbare Tubulinpopulationen vorkommen und daß insgesamt mindestens vier verschiedene Tubulinkomponenten vorliegen. Jede dieser Komponenten ist zwar in beiden untersuchten Organen vorhanden, die Mengenverhältnisse sind jedoch unterschiedlich, so daß man die saure Seite der β-Untereinheit und die basische Seite der α-Untereinheit als "überwiegend adulte" Tubuline und die anderen Seiten der Tubulinpeaks als "überwiegend larvale" Tubuline bezeichnen kann. Diese Klassifizierung erlaubt aber keine Aussage über den tatsächlichen Ursprung und die Funktion der einzelnen Untereinheiten, zumal in den Peaks noch weitere Komponenten enthalten sein können und bei diesem Vergleich die Tubuline der somatischen Zellen auch einen wesentlichen Anteil beitragen werden.

4. Charakterisierung der in vitro synthetisierten Proteine mit einem Molekulargewicht von 52 000 Dalton

In larvalen Hodenanlagen wird in vivo ein 52 000 Dalton Protein nicht in wesentlich größeren Mengen als andere Polypeptide synthetisiert. Im Gegensatz dazu dirigiert die RNA aus larvalen Hodenanlagen und davon besonders die RNA des 10 000 g-P, in vitro die Synthese verhältnismäßig großer Mengen an 52 000 Dalton Protein. Deshalb wurde untersucht, ob Gemeinsamkeiten zwischen diesem in vitro synthetisierten Protein und dem in großen Mengen in adulten Hoden vorkommenden Tubulin bestehen.

4.1. Zweidimensionale Elektrophorese der in vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P-RNA

Die in vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P-poly(A)$^+$-RNA im 52 000 Dalton Bereich wurden wie in Kap. 8.3. beschrieben elektrofocussiert. Parallel dazu wurden die in vivo synthetisierten Proteine mit diesem Molekulargewicht aufgetrennt (Abb. 19).
Die in-vitro translierten Polypeptide stimmen im isoelektrischen Punkt mit den in vivo synthetisierten Tubulinen überein und liegen sowohl im SDS-Gel als auch bei der Isoelektrofocussierung als zwei Komponenten vor. Sie sind die häufigsten Proteine im untersuchten pH-Bereich, deren Synthese von der 10 000 g-P-RNA dirigiert wird; daneben tritt ein Peak mit einem mehr basischen isoelektrischen Punkt als die Tubulinhauptfraktionen auf. Dieses Protein (3) wird bei dem selben pH-Wert focussiert wie ein Polypeptid, das im Vinblastin-fällbaren Material aus adulten Hoden enthalten ist (Abb. 17a (3), Abb. 18) und im SDS-Gel zusammen mit den Tubulinen im 52 000 Dalton Bereich wandert (Abb. 19a).

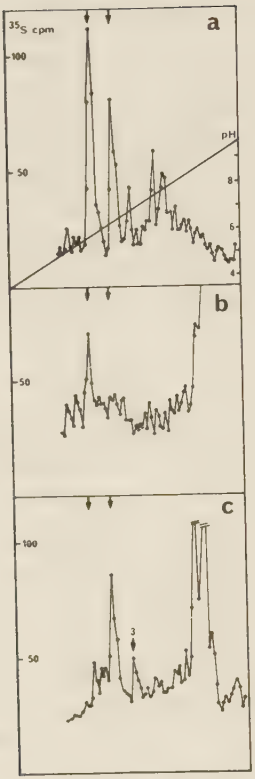


Abbildung 19: Isoelektrofocussierung
a) der Proteine des gesamten 52 000 Dalton Bereichs in vivo markierter adulter Hoden,
b) und c) der Proteine in zwei aufeinander folgenden 1 mm-Gelscheibchen aus dem 52 000 Dalton Bereich der in vitro Translationsprodukte, die von der RNA des 10 000 g-P dirigiert werden.
Die Pfeile markieren die Position der Tubuline.
Die zwei basischen Komponenten in c) sind Bestandteile des internen Proteins (Pi50).

4.2. Fällung der in vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P-RNA mit Vinblastin

Die in vitro Translationsprodukte, die von der 10 000 g-P-RNA dirigiert werden, wurden unter Zugabe von Gesamtproteinextrakt aus adulten Hoden als Carrier und Molekulargewichtsmarker mit Vinblastin gefällt. Das Präzipitat wurde in einem SDS-Gelgradienten aufgetrennt. Die beiden radioaktiv markierten in vitro synthetisierten Komponenten haben im Gel dieselbe Position wie die anfärbbaren Tubuline (Abb. 20).

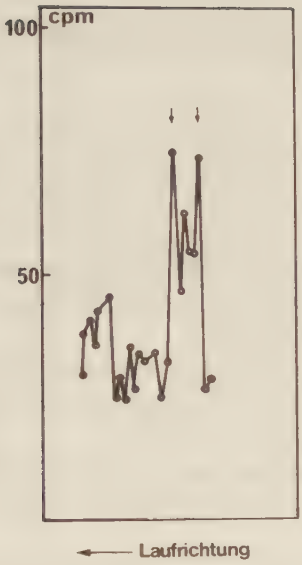


Abbildung 20: Auftrennung der Vinblastin-fällbaren in vitro Translationsprodukte, deren Synthese von der 10 000 g-P-RNA dirigiert wird. Es ist der 52 000 Dalton Bereich in einem SDS-Gelgradienten dargestellt.
Die Pfeile geben die Position der als Marker coelektrophoretisierten Tubuline an.

Diese Ergebnisse zeigen, daß zumindest ein Teil der Proteine im 52 000 Dalton Bereich, deren Synthese in vitro von der 10 000 g-P--RNA dirigiert wird, in allen untersuchten Eigenschaften mit den Tubulinen übereinstimmt.

5. Proteinsynthese in adulten Hoden nach einer Behandlung mit Actinomycin D

Wenn die drei translierbaren Messengergruppen der 10 000 g-P-Fraktion Speicherformen darstellen, so sollte speziell die Synthese der Proteingruppen mit Molekulargewichten von 29 000, 39 000 und 52 000 Dalton in adulten Hoden teilweise von einer RNA-Neusynthese unabhängig sein.
Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Transcription in adulten Hoden durch Actinomycin D inhibiert und die darauf folgende Proteinsynthese mit der in unbehandelten Hoden verglichen.

5.1. Translationsaktivität in verschiedenen Hodenteilen nach einer Behandlung mit Actinomycin D

Adulte Hoden wurden 12h in Gegenwart von Actinomycin D inkubiert und anschließend für weitere 11h mit ^{3}H-Leucin markiert (Act. D^{+}). Zum Vergleich wurden parallel dazu Hoden ohne vorherige Actinomycin D-Behandlung mit ^{14}C-Leucin markiert (Act. D^{-}). Die Hoden wurden dann in drei Teile zerschnitten, von denen Teil 1 Spermatogonien und Spermatocyten enthielt, Teil 2 Spermatiden und Teil 3 ältere Spermatiden, Spermien und den größten Teil der Hodenhülle.
Vergleicht man die eingebaute Radioaktivität in der Actinomycin D behandelten Probe mit der Kontrolle (Act. D^{-}), so kommt man zu folgenden Ergebnissen (Tabelle 4):

1. Der Teil 2 der Actinomycin D behandelten Hoden enthält prozentual einen größeren Anteil an neusynthetisierten Proteinen als der Teil 2 der unbehandelten Hoden.
2. Das C/T-Verhältnis im Teil 2 ist im Vergleich zu den beiden anderen Teilen deutlich zu Gunsten der Actinomycin D behandelten Probe verschoben.

Tabelle 4:

	Act. D^{+} (^{3}H)	Act. D^{-} (^{14}C)	$^{14}C/^{3}H$
Teil 1	11.9%	15.5%	3.2
Teil 2	23.9%	17.8%	1.8
Teil 3	64.1%	66.8%	2.6

(Mittelwerte aus fünf geschnittenen Hoden)

Aus den Daten ist zu schließen, daß zumindest ein Teil der Proteinsynthese in Teil 2 von einer RNA-Neusynthese unabhängig ist.

5.2. Vergleich der neusynthetisierten Proteine aus Actinomycin D behandelten und aus unbehandelten Hoden

Adulte Hoden, die 3h in Gegenwart von Actinomycin D inkubiert und anschließend für 12h mit ^{3}H-Leucin markiert worden waren, wurden zusammen mit unbehandelten ^{14}C-Leucin-markierten Hoden aufgearbeitet und die Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 21). C/T-Unterschiede zu Gunsten der Actinomycin D behandelten Probe (nach unten) weisen auf Proteine hin, deren Synthese durch eine Hemmung

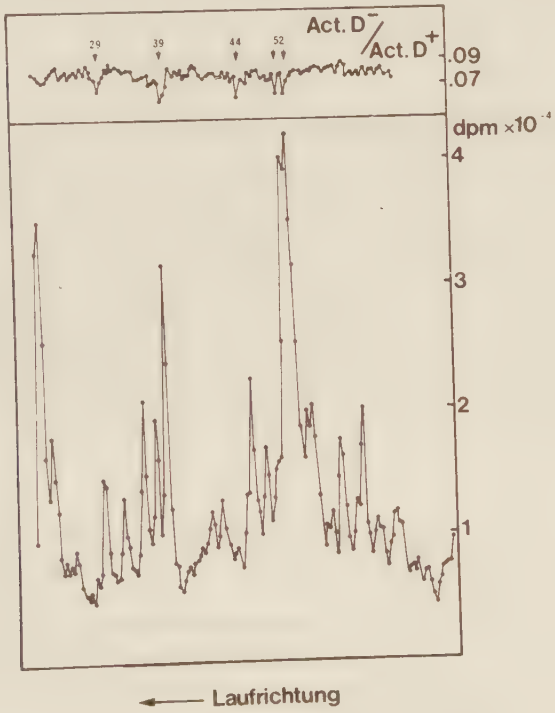


Abbildung 21: Vergleich der Proteinsynthese in adulten Hoden (Act. D^-) mit der Proteinsynthese in Actinomycin D behandelten Hoden (Act. D^+). Die Pfeile markieren C/T-Unterschiede, die auf Proteine hinweisen, deren Synthese von einer Transcription unabhängig ist.

der Transcription weniger beeinflußt wird. Solche C/T-Peaks treten bei vier Proteingruppen auf: bei zwei Komponenten im 52 000 Dalton Bereich, einem 44 000 Dalton Protein (wahrscheinlich Actin) und bei zwei Polypeptiden mit Molekulargewichten von 29 000 und 39 000 Dalton.

Die Ergebnisse zeigen, daß Proteingruppen, die die selben Molekulargewichte haben wie die in vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P--RNA in adulten Hoden weitgehen unabhängig von einer RNA-Neusynthese transliert werden.

6. Charakterisierung der 10 000 g-P-Fraktion

Den bisherigen Ergebnissen ist zu entnehmen, daß im 10 000 g-P Messenger angereichert sind, die in vitro die Synthese von drei Proteingruppen dirigieren. Diese Proteingruppen sind in den in vitro Translationsprodukten der entsprechenden RNA-Fraktion aus X/0 Hoden nicht erfaßbar; aus diesem Grund sollten molekulare Unterschiede zwischen den beiden Fraktionen zu finden sein. Um solche Unterschiede zu charakterisieren wurde das 10 000 g-P aus X/Y und X/0 Hoden auf verschiedene Art fraktioniert und in Doppelmarkierungsexperimenten verglichen.

6.1. Vergleich der poly(A)$^+$-RNA des 10 000 g-P aus X/Y und X/0 Tieren

Nach einer radioaktiven Markierung von 24h wurde die poly(A)$^+$-RNA des 10 000 g-P aus den Hodenanlagen von X/Y und X/0 Tieren isoliert und in einem exponentiellen Polyacrylamidgelgradienten unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (Abb. 22).
Die RNA ist von heterogener Größe und um etwa 500 000 Dalton verteilt. Signifikante Abweichungen im C/T-Verhältnis treten, abgesehen von nicht auswertbaren Schwankungen in Bereichen geringer Radioaktivität, nicht auf. Die Größenverteilung der RNA und die C/T-Verhältniskurve ändern sich nicht, wenn die RNA einer zusätzlichen Reinigung über

einen CsCl-Stufengradienten unterzogen wird oder die poly(A)$^+$-RNA mit oligo(dT)-Cellulose anstelle von poly(U)-Sepharose isoliert wird.

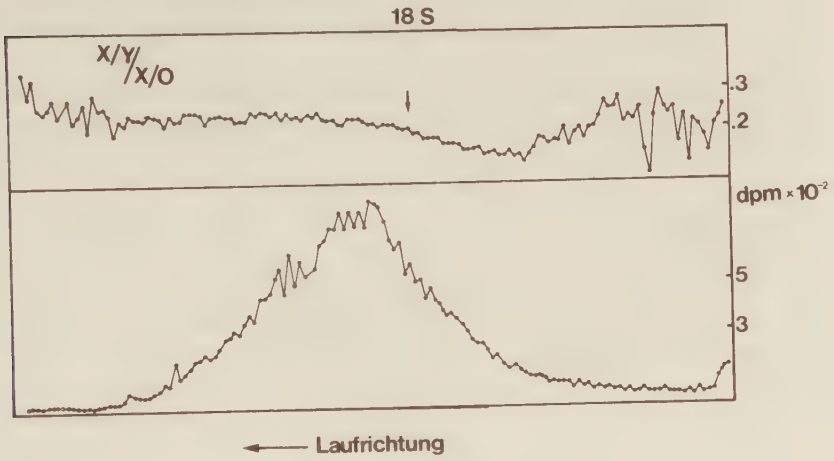


Abbildung 22: Vergleich der poly(A)$^+$-RNA des 10 000 g-P aus X/Y und X/O Hodenanlagen. Der Pfeil markiert die Position von 18 S rRNA (7×10^5 Dalton), die als Molekulargewichtsmarker coelektrophoretisiert wurde.

6.2. Translation fraktionierter poly(A)$^+$-RNA aus dem 10 000 g-P

Die RNA des 10 000 g-P ist über einen weiten Molekulargewichtsbereich verteilt; distinkte Radioaktivitätspeaks, die den drei in vitro translierbaren mRNAs zugeordnet werden könnten, treten nicht auf. Das kann daran liegen, daß sie von nicht translierbarer RNA überdeckt werden, oder aber die gespeicherten Messenger enthalten nach einer Markierungszeit von 24h noch nicht genügend Radioaktivität um sie erfassen zu können.
Eine andere Möglichkeit,die Messenger zu charakterisieren und eventuell von einander zu trennen, besteht darin, die RNA nach ihrer

Größe zu fraktionieren und in vitro zu translieren.
Die poly(A)$^+$-RNA des 10 000 g-P wurde in einem Saccharosegradienten aufgetrennt, in sechs S-Wert-Klassen fraktioniert und in-vitro translatiert.
Die Translationsaktivitäten der einzelnen Fraktionen (Tabelle 5) machen bereits deutlich, daß der Großteil der Messenger in Fraktion drei enthalten sein muß.

Tabelle 5:

Fraktion	S-Wert	Translations-aktivität
I	bis 8 S	1 X
II	bis 13 S	2 X
III	bis 18 S	4.1 X
IV	bis 26 S	2.3 X
V	bis 34 S	2.1 X
VI	bis 50 S	5.1 X$^+$

$^+$artifizielle Stimulation, die Translationsprodukte enthalten keine spezifischen Proteine.

Die Auftrennung im SDS-Gel (ohne Abb.) bestätigt diese Annahme: alle drei Proteingruppen sind in den in vitro Translationsprodukten der Fraktion III enthalten und sonst in keiner Fraktion nachweisbar. Die Trennung der einzelnen Messengergruppen von einander ist also mit dieser Methode nicht möglich; alle drei mRNAs sedimentieren zwischen 13 und 18 S.

6.3. Vergleich der im 10 000 g-P enthaltenen RNPs aus X/Y und X/0 Hodenanlagen

Eine weitere Möglichkeit, Unterschiede zwischen den Genotypen X/Y

und X/O zu erfassen, besteht darin, die im 10 000 g-P enthaltenen RNPs zu vergleichen. Mit dieser Methode könnten auch Unterschiede gefunden werden, die nicht in der RNA selbst liegen, sondern auf verschiedenartiger Organisation der RNA in RNP-Partikeln beruhen. Das 10 000 g-P wurde in RNP-Isolationspuffer C_{10} (Knust et al., 1978) homogenisiert (0.01M NaCl, 0.01M $MgCl_2$, 0.01M Tris-HCl pH 7, 2 mg Heparin/ml, 0.005M Mercaptoäthanol) und in einem 5 - 50%igen Saccharosegradienten aufgetrennt. Der Gradient wurde in 0.2 ml-Fraktionen ausgetropft, er enthält hauptsächlich zwei RNP-Fraktionen von etwa 40 bzw. 80 S; ca. 50% der radioaktiven RNA sind in RNPs enthalten, die bis zum Boden des Röhrchens sedimentieren und deshalb S--Werte von mehr als 180 haben müssen (10 000 g-P-P). Die C/T-Verhältniskurve weist wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf (Abb. 23). Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn das 10 000 g-P nach der Polysomenisolierung aufgearbeitet wird (Lassak, Kloetzel, pers. Mitt.).

6.4. Translation der RNA aus RNP-Fraktionen des 10 000 g-P

Um die drei translierbaren mRNA-Gruppen des 10 000 g-P einer RNP--Fraktion zuordnen zu können wurde die poly(A)$^+$-RNA aus den in Abb. 23 markierten Fraktionen isoliert und in vitro transliert. Signifikante Translationsaktivitäten treten nur mit der RNA aus Fraktion III und aus dem 10 000 g-P-P auf (Tabelle 6).

Tabelle 6:

Fraktion	Translationsaktivität
I	1.0 X
II	1.3 X
III	2.5 X
10 000 g-P-P	3.3 X

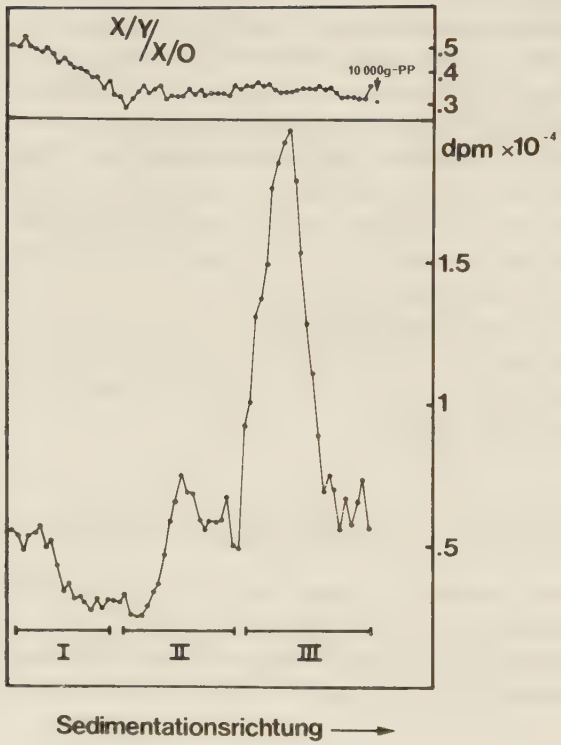


Abbildung 23: Vergleich der im 10 000 g-P enthaltenen RNPs aus X/Y und X/O Hodenanlagen. Die Balken markieren die Fraktionen, die weiter untersucht wurden.

Die 10 000 g-P-P-RNA dirigiert trotz einer recht hohen Translationsaktivität keine Synthese von Proteinen im untersuchten Molekulargewichtsbereich (Abb. 24a), in der Fraktion III sind wiederum alle drei Messengergruppen enthalten, die für Proteine mit Molekulargewichten von 29 000, 39 000 und 52 000 Dalton codieren (Abb. 24b). Die mRNAs sind folglich in RNPs enthalten, die zwischen 60 und 80 S sedimentieren.

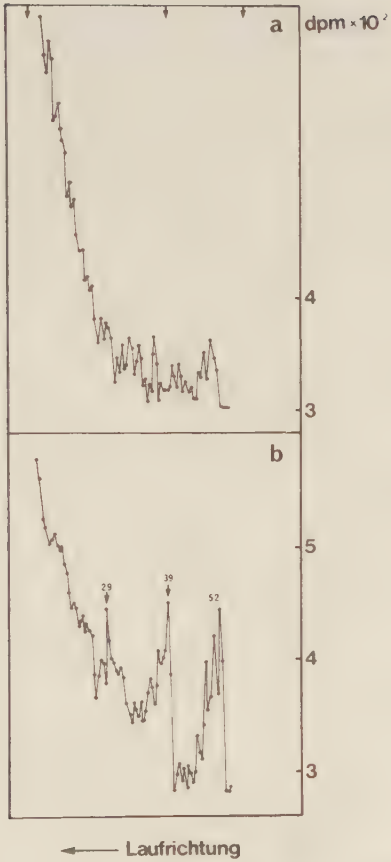


Abbildung 24: In vitro Translationsprodukte der RNA aus RNP-Fraktionen,
a) Translationsprodukte der RNA des 10 000 g-P-P,
b) Translationsprodukte der RNA aus Fraktion III (siehe Abb. 23).

6.5. Untersuchung der Proteine der RNP-Fraktion III

Um die RNP-Partikel, in denen die translierbare RNA des 10 000g-P enthalten ist, näher zu beschreiben, wurden die Proteine der Fraktion III (Abb. 23) in einem SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 25).
Obwohl ein breiter Bereich aus dem Saccharosegradienten verarbeitet

wurde, sind in der Fraktion nur wenige distinkte Proteine enthalten; ihnen wurden Molekulargewichte von 26 000, 30 000 und 72 000 Dalton zugeordnet.

Aufgrund dieser Proteinverteilung kann eine Kontamination mit Ribosomen ausgeschlossen werden. Besonders die beiden niedermolekularen Komponenten können als typische cytoplasmatische Proteine bezeichnet werden, die in larvalen Hodenanlagen stark vertreten sind (Kloetzel, 1979).

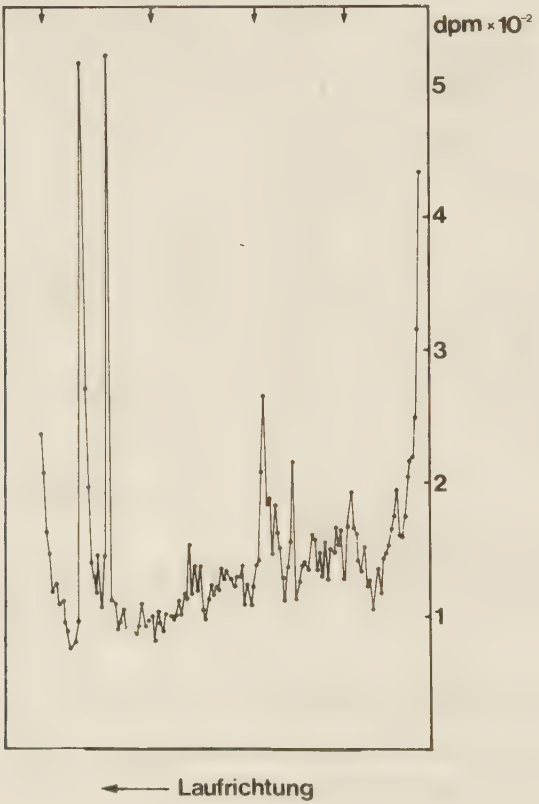


Abbildung 25: Auftrennung der Proteine aus der RNP-Fraktion III (Abb. 23) im SDS-Gel. Die Pfeile markieren die Position der Eichproteine.

Wegen der begrenzten Markierungszeit besteht jedoch bei den Proteinen wie bei der RNA die Möglichkeit, daß die RNPs noch nicht genügend Radioaktivität enthalten, um sie erfassen zu können; es ist also nicht sichergestellt, daß die markierten Proteine tatsächlich Bestandteile der RNPs sind, die die translierbaren Messenger enthalten, sie könnten auch Bestandteil anderer RNPs sein.

7. In-situ Hybridisierung

Mit unterschiedlichen Fraktionierungsverfahren sind keine Unterschiede zwischen der 10 000 g-P-RNA aus den Hodenanlagen von X/Y und X/O Tieren zu finden. Auf der anderen Seite weisen die in vitro Translationsprodukte, die von der RNA dieser Fraktion dirigiert werden, deutliche Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf. Diese Beobachtung kann auf verschiedene Art erklärt werden:
1. In beiden Genotypen ist die gleiche RNA vorhanden, in einem jedoch geringfügig verändert, sodaß wohl ihre physiologische Aktivität, nicht jedoch ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgelgradienten beeinflußt wird.
2. Die translierbare RNA fehlt tatsächlich im X/O Genotyp oder ist dort stark reduziert; Unterschiede im C/T-Verhältnis sind aber nicht festzustellen, weil sie entweder von anderen, nicht translierten RNAs überdeckt werden oder weil die translierbare RNA der X/Y Tiere in dieser Fraktion innerhalb von 24 Stunden nicht ausreichend radioaktiv markiert wird, um einen C/T-Unterschied erfaßbar zu machen.

Weil die Translationsaktivität der 10 000 g-P-RNA von der Anwesenheit des Y-Chromosoms abhängig ist, muß man in beiden Fällen eine Y-chromosomale Steuerung annehmen, die bei der ersten Möglichkeit eine Modifikation der RNA bewirken würde und bei der zweiten die Transcription oder die Speicherung prämeiotisch transcribierter RNA aus X/Y Tieren ermöglicht, während die entsprechende RNA der X/O Tiere gar nicht erst transcribiert oder nach der Transcription degradiert wird.
Eine Möglichkeit einer solchen Steuerung könnte darin bestehen, daß die RNA direkt an den Lampenbürstenschleifen prozessiert, modi-

fiziert oder verpackt wird. In diesem Fall wäre eine Hybridisierung von 10 000 g-P cDNA an den Schleifen zu erwarten.
Unter der Voraussetzung, daß es sich tatsächlich um autosomal oder X-chromosomal codierte RNA handelt, sollte man bei einer Hybridisierung auf polytäne Chromosomen eine Markierung über wenigen Banden finden, die die Genorte für die Proteingruppen enthalten.

7.1 Hybridisierung von 10 000 g-P-cDNA auf die RNA in primären Spermatocytenkernen

10 000 g-P-cDNA wurde auf die RNA in primären Spermatocytenkernen hybridisiert; die Exposition erfolgte für 15 bis 20 Tage.
Die Präparate (Abb. 26) wurden ausgewertet, indem die Silberkörner über einigen Kernen ausgezählt und Vergleiche zwischen Kernstrukturen, cytoplasmatischem "background" und verschiedenen Kernregionen angestellt wurden (Tabelle 7).

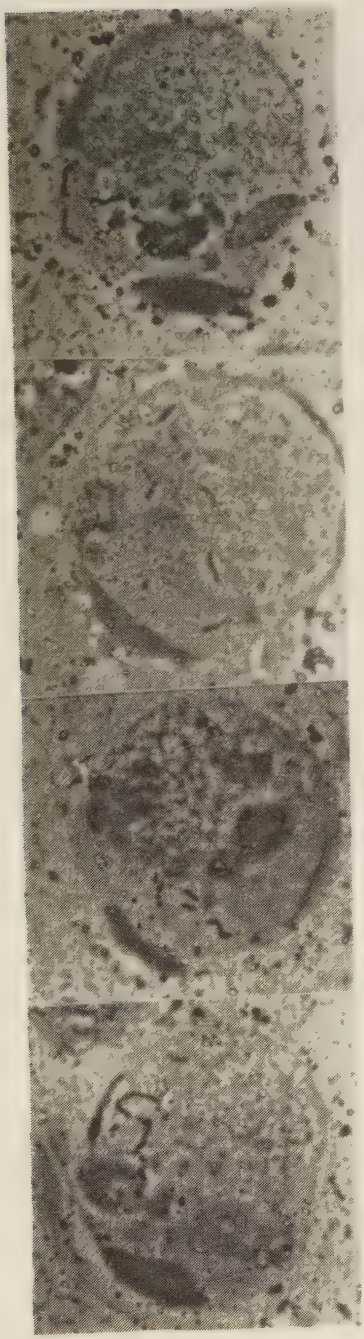
Tabelle 7:

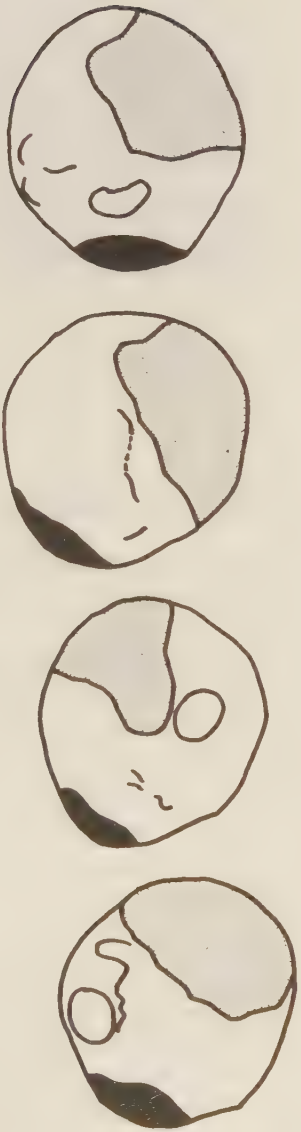
Vergleich	n	Ø	Sigma	Varianz
K/C	9	2.1	0.32	15%
"T"/K	9	1.8	0.23	13%
NO/$\bar{C}$	8	0.98	0.14	14%
P/$\bar{C}$	5	1.05	0.16	15%

Die Buchstaben stehen für die Anzahl der Körner über: K = Kerne, C = Cytoplasmaausschnitt, "T" = Strukturen, die wahrscheinlich die Tubulibänder darstellen, P = Pseudonukleolus, NO = Nukleolus, $\bar{C}$ = Mittelwert aus sechs Cytoplasmabereichen. Es wurden stets flächengleiche Regionen verglichen. n = Probenanzahl.

Diesen Daten ist zu entnehmen:

1. Die Markierung über den Kernen ist etwa doppelt so groß wie über dem Cytoplasma; das heißt, es findet eine spezifische Hybridisierung in den Kernen statt.





2. Die Hybridisierung ist nicht gleichmäßig über den Kern verteilt: während die Markierung über der Region "T" deutlich höher ist als in anderen Kernbereichen, unterscheidet sich die Zahl der Silberkörner über Nukleolus und Pseudonukleolus nicht vom cytoplasmatischen "background".

Bei einer Hybridisierung der gleichen cDNA-Probe auf Spermatocytenkerne von X/O Tieren findet man ebenfalls eine spezifische Anhäufung von Silberkörnern in den Kernen im Vergleich zum Cytoplasma (Abb. 27). Die Verteilung der Körner ist hier jedoch gleichmäßiger und es ist eine Konzentrierung der radioaktiven Markierung an der Innenseite der Kernmembran zu beobachten. Über dem Nukleolus befindet sich wiederum keine Markierung, die über dem "background" liegt. Die Verteilung der Silberkörner ist eindeutig von einer Hybridisierung mit poly(A)-cDNA zu unterscheiden, wo eine Konzentrierung der Markierung an der Kernmembran nicht festzustellen ist (siehe Abb. 6).

Vergleicht man in-situ Hybridisierungen der gleichen cDNA-Probe auf Spermatocytenkerne der Genotypen X/Y und X/O, so sind folgende Unterschiede zu bemerken:
1. Die Verteilung der Silberkörner über den X/O Kernen ist gleichmäßig, es findet eine Konzentrierung der Markierung an der Kernmembran statt.
2. Die Verteilung der Silberkörner über den X/Y Kernen ist nicht gleichmäßig sondern vorzugsweise an bestimmte Strukturen gebunden. Eine Konzentrierung radioaktiver Markierung an der Kernmembran ist nicht zu beobachten.
3. Die X/O Kerne sind vergleichsweise stärker markiert als die X/Y Kerne.

Abbildung 26: In-situ Hybridisierung von 10 000 g-P-cDNA auf die RNA in den Kernen primärer Spermatocyten aus X/Y Tieren.
Die Kerne sind zur Orientierung rechts schematisch dargestellt. Der Nukleolus ist schwarz, die Region, in der die Tubulibänder vermutet werden, schraffiert eingezeichnet.

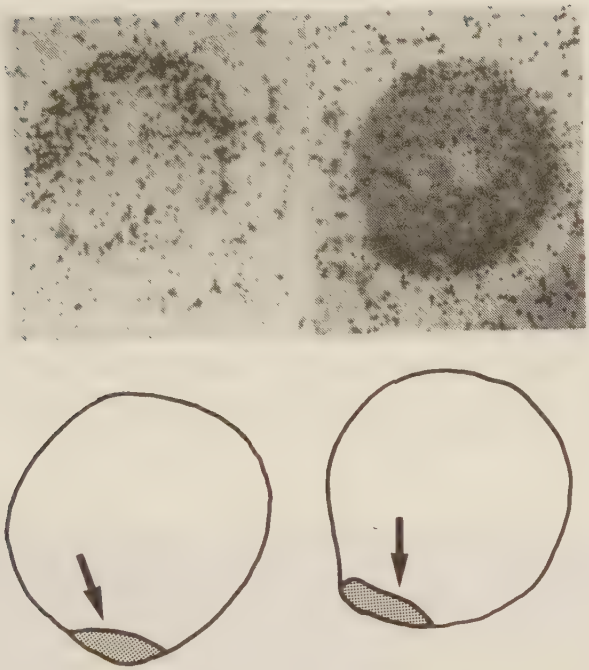


Abbildung 27: In-situ Hybridisierung von 10 000 g-P-cDNA auf die RNA in den Kernen primärer Spermatocyten aus X/0 Tieren. Die Kerne sind zur Orientierung unten schematisch dargestellt. Der Nukleolus ist schraffiert.

Obwohl die X/0 Kerne weniger RNA enthalten als die X/Y Kerne (Knust, 1979), ist es nicht auszuschließen, daß Sequenzen der 10 000 g-P-RNA in den X/0 Kernen angereichert sind. Wenn in beiden Genotypen die gleiche RNA hybridisiert, die strukturgebundenen X/Y RNA-Sequenzen also mit den "freien" (nicht strukturgebundenen) X/0 RNA-Sequenzen identisch sind, könnten die Ergebnisse auch so interpretiert werden, daß die RNA in den X/Y Kernen aufgrund ihrer Verpackung für eine Hybridisierung schlechter zugänglich ist als die "freie" RNA der X/0 Kerne. Dagegen spricht jedoch, daß unter den Hybridisierungsbedingungen die RNP-Komplexe aufgelöst sein sollten.

7.2. Hybridisierung von 10 000 g-P-cDNA auf die DNA in polytänen Chromosomen

Durch diese Hybridisierung sollte festgestellt werden, ob die Genorte für die drei im 10 000 g-P enthaltenen Messenger auf den polytänen Chromosomen lokalisiert werden können.
Es findet eine Hybridisierung an den Chromosomen statt, die deutlich über dem radioaktiven "background" liegt, einzelne Banden sind auch stärker markiert als ihre Umgebung (Abb. 28) und es könnte sich dabei um Genorte handeln, deren Messenger im 10 000 g-P angereichert sind. Weil aber die Signifikanz dieser Markierung zu gering ist, wurde auf eine Einordnung der Banden und eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Hybridisierung verzichtet.

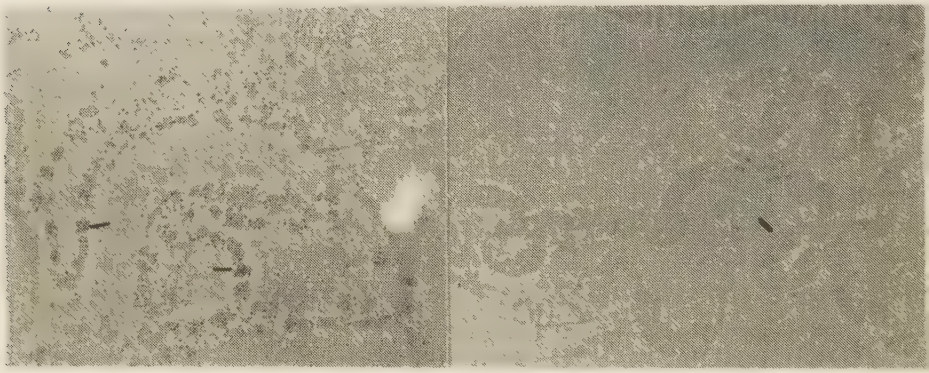


Abbildung 28: In-situ Hybridisierung von 10 000 g-P-cDNA auf die DNA in polytänen Chromosomen. Die Pfeile markieren Chromosomenbanden, die eine stärkere Markierung tragen.

IV. Diskussion

In der ersten meiotischen Prophase treten in den Spermatocytenkernen von Drosophila Y-chromosomale Lampenbürstenschleifen auf, deren Anwesenheit eine Voraussetzung für den geordneten Ablauf der weiteren Spermatogenese ist. Hess (1965) und Schäfer (1975) konnten nachweisen, daß die Ausfaltung und die Morphologie der Schleifen Y-autonom ist und Hennig (1967) wies beträchtliche Mengen neusynthetisierter RNA an den Schleifen nach.

Aufgrund dieser Beobachtungen könnte man zwar eine RNA-Synthese am Y-Chromosom vermuten, die Ergebnisse können aber auch anders interpretiert werden, so daß kein Widerspruch darin besteht, daß bisher weder eine Y-chromosomal codierte RNA noch ein von solcher RNA transliertes Protein gefunden wurde.

Die Ergebnisse von Knust (1979) und Kloetzel (1979) zeigen, daß in Abhängigkeit von der Schleifenausfaltung eine Akkumulation autosomal oder X-chromosomal codierter RNA und Proteine in den Kernen primärer Spermatocyten stattfindet. Diese Befunde geben zu der Vermutung Anlaß, daß die Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen von Drosophila teilweise andere Funktionen haben als die, die für die Lampenbürstenschleifen der Amphibien beschrieben werden.

Die Y-Chromosom-abhängige Regulation der Spermatogenese findet in postmeiotischen Stadien statt, in denen die Hälfte der Spermatiden bereits kein Y-Chromosom mehr enthält; weiterhin ist in diesen Stadien keine RNA-Synthese mehr nachweisbar (Hennig, 1967; Olivieri et al., 1965; Lassak et al., 1979), obwohl noch eine starke Proteinsynthese gefunden wird. Daraus ist zu schließen, daß die Prozesse, die für eine geordnete Spermatogenese notwendig sind, bereits in prämeiotischen Stadien ablaufen müssen.

Abgesehen von Befunden an Kern-RNPs (Kloetzel, 1979) können wesentliche Unterschiede im Gesamtproteinmuster zwischen X/Y Tieren und Y-defizienten Tieren erst in postmeiotischen Stadien festgestellt werden. Die auffälligsten Unterschiede sind im 52 000 Dalton Molekulargewichtsbereich zu finden.

Eine Fällung der Proteine aus adulten Hoden mit Vinblastin zeigt, daß die Unterschiede in diesem Bereich ausschließlich im Vinblastin-

-fällbaren Material liegen, das heißt auf unterschiedlicher Synthese von Tubulinen oder Tubulin-assoziierten Proteinen beruhen. Die nicht mit Vinblastin fällbaren Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 52 000 Dalton werden in X/Y, X/O und X/A.Y^{PF} Tieren in gleichen Mengen synthetisiert (Abb. 16, Abb. 17).

Vergleicht man adulte Hoden, so fällt auf, daß die Organe aus X/Y Tieren sehr viel länger sind als die aus X/O oder X/A.Y^{PF} Tieren; in den somatischen Zellen der Hodenhülle konnten weiterhin große Mengen an Mikrotubuli nachgewiesen werden (Glätzer, pers. Mitt., Rungger-Brändle, 1977),so daß man zunächst vermuten könnte, daß die Unterschiede im Tubulingehalt hauptsächlich auf die Länge der Hoden und damit auf das somatische Material der Hodenhülle zurückzuführen sind. Dagegen spricht jedoch, daß ein Teil der Tubuline in adulten Hoden von gespeicherter mRNA transliert wird, die in somatischen Zellen nicht vorkommen sollte (siehe Kap. 5). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß die Unterschiede im Tubulingehalt weder in prämeiotischen Zellen (Lassak, 1979) noch in somatischen Hodenzellen liegen, sondern ausschließlich im postmeiotischen Keimbahnmaterial zu finden sind (Lassak, pers. Mitt.).

Bei der Auftrennung der Vinblastin-fällbaren Proteine adulter Hoden in SDS-Polyacrylamidgelgradienten entsteht der Eindruck, daß die Unterschiede zwischen X/Y und X/O Tieren allein in den Hauptbanden der beiden Tubulinuntereinheiten liegen, die im SDS-Gel aufzutrennen sind (Abb. 16).

Bei der Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt stellt sich jedoch heraus, daß die wesentlichen Unterschiede nicht in den Tubulinhauptbanden, sondern in anderen Komponenten liegen, die in geringeren Mengen synthetisiert werden und im SDS-Gel wohl mit der Masse der α- und β-Ketten comigrieren, bei der Isoelektrofocussierung jedoch von diesen abgetrennt werden können (Abb. 17).

Bei diesen Komponenten könnte es sich einmal um Polymerisationsfaktoren wie die Tau-Proteine handeln, die bei der verwendeten Methode wahrscheinlich mit den Tubulinen präzipitiert werden und im SDS-Gel zum Teil dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit wie die Tubulinuntereinheiten haben (Herzog et al., 1978). Andererseits könnte es sich auch um Tubulinuntereinheiten verschiedenen Ursprungs handeln, die unter

entsprechenden elektrophoretischen Bedingungen von einander getrennt werden können. So konnte z.B. gezeigt werden, daß deutliche Unterschiede zwischen den Tubulinen des mitotischen Spindelapparates und denen der Flagellen des Seeigels bestehen (Bibring et al., 1976). Die Unterschiede beruhen dabei weniger auf der Größe der Moleküle sondern eher auf deren Ladung,so daß eine Auftrennung dieser Komponenten durch Isoelektrofocussierung besser möglich ist als im SDS--Gelgradienten.
Hinweise auf verschiedene Tubuline gibt es auch beim Vergleich der Vinblastin-fällbaren Proteine aus larvalen Hodenanlagen und adulten Hoden. Dabei wird deutlich, daß in Drosophila mindestens vier verschiedene Tubulinuntereinheiten vorkommen, die in larvalen Hodenanlagen und in adulten Hoden in unterschiedlichen Verhältnissen vorkommen (Abb. 18). Diese Unterschiede sind dadurch zu erklären, daß der Großteil der Tubuline in adulten Hoden für die Spermatidenstrekkung und die Spermienflagellen benötigt wird, hinzu kommen die Tubuline der somatischen Hodenhüllzellen; in larvalen Hodenanlagen wird dagegen die Masse der Tubuline im mitotischen und meiotischen Spindelapparat zu finden sein.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, daß die Unterschiede in der Proteinsynthese zwischen X/Y Tieren und Y-defizienten Tieren sowohl in Tubulinuntereinheiten als auch in Tubulin-assoziierten Proteinen liegen:
1. Die C/T-Peaks im Tubulinbereich (1 und 2 in Abb. 17) stellen sehr wahrscheinlich Unterschiede in der Synthese von Tubulinuntereinheiten dar, die in relativ geringer Menge synthetisiert werden. Für diese Annahme spricht auch, daß beim Vergleich des anfärbbaren Vinblastin-fällbaren Materials aus adulten Hoden der Genotypen X/Y, X/O und $X/A.Y^{PF}$ eine geringere Synthese von zwei Polypeptiden in den Y-defizienten Tieren festzustellen ist, die mit den C/T-Peaks 1 und 2 korreliert werden können. Diese Polypeptide sind nach der Anfärbbarkeit in etwa gleich großen Mengen vorhanden wie die Tubulinhauptbanden (Kloetzel, Glätzer, pers. Mitt.), werden aber bei einer radioaktiven Markierung in Organkultur sehr viel schwächer als diese markiert. Bei diesen Komponenten kann es sich nicht um Tau-Proteine

oder andere Cofaktoren handeln, weil diese maximal im Verhältnis 1 : 10 im Vergleich zu den Tubulinen vorkommen (Hiller, pers. Mitt.). Aufgrund des anfärbbaren Materials und der radioaktiven Markierung kann geschlossen werden, daß diese Polypeptide in X/O Tieren zwar in geringeren Mengen synthetisiert werden, nicht aber ganz ausfallen; es kann sich deshalb nicht um Produkte handeln, die ausschließlich vom Y-Chromosom codiert sind.

2. Die C/T-Peaks 3 und 4 (Abb. 17) können eher Tubulin-assoziierten Proteinen zugeordnet werden. Die isoelektrischen Punkte dieser Polypeptide liegen weiter von denen der Tubuline entfernt und sie kommen in relativ geringen Mengen vor. Dabei kann zumindest für das Protein, das den C/T-Peak 3 ausmacht mit Sicherheit gesagt werden, daß es im 52 000 Dalton Molekulargewichtsbereich liegt.

Die P52-in vitro Translationsprodukte der 10 000 g-P-RNA treten sowohl bei der Isoelektrofocussierung als auch im SDS-Gel als zwei Hauptbanden auf (Abb. 19). Ihr Wanderungsverhalten entspricht dabei dem der beiden auftrennbaren Tubulinpeaks. Daneben tritt bei der Isoelektrofocussierung noch mindestens eine weitere Komponente mit einem mehr basischen isoelektrischen Punkt auf, die ebenfalls einem in vivo synthetisierten Polypeptid aus dem 52 000 Dalton Bereich zugeordnet werden kann. Dieses Produkt entspricht weiterhin dem Protein, das mit dem C/T-Peak 3 im Vinblastin-fällbaren Material aus adulten Hoden zu korrelieren ist (Abb. 17). Das heißt, es wird in den Y-defizienten Tieren vermindert synthetisiert. Außerdem ist dieses Protein in adulten Hoden stärker vertreten als in larvalen Hodenanlagen (Abb. 18).

Man könnte zunächst annehmen, daß die beiden in vitro stark synthetisierten Proteine mit den Tubulinuntereinheiten identisch sind, die in vivo im adulten Hoden die Masse der Radioaktivität enthalten. Zieht man aber in Betracht, daß in adulten Hoden aus X/O Tieren zwei Tubulinuntereinheiten vermindert vorkommen und in der 10 000 g-P-RNA der larvalen Hodenanlagen die mRNA für zwei Tubuline im Gegensatz zum X/Y Genotyp in vitro bereits nicht zu translieren ist, so liegt der Schluß nahe, daß es sich dabei um die gleichen Tubulinuntereinheiten handelt. Eine sichere Aussage ist jedoch nicht möglich, weil im Be-

reich der Tubuline mindestens vier Komponenten liegen, die so ähnlich sind, daß ihre Auftrennung an der Grenze des Auflösungsvermögens der Isoelektrofocussierung liegt.[+)]

Die poly(A)-haltige RNA des 10 000 g-P enthält die mRNA für drei Proteingruppen, die in vitro transliert werden können und von denen eine als Tubuline identifiziert werden konnte.
Bei der 10 000 g-P-RNA muß es sich im Wesentlichen um Keimbahnmaterial handeln, weil der Anteil an somatischen Zellen in larvalen Hodenanlagen sehr gering ist und die Experimente mit Actinomycin D (Kap. 5) weiterhin zeigen, daß gerade die Proteine, deren mRNA in der 10 000 g-P-RNA enthalten ist, in postmeiotischen Keimbahnzellen transliert werden (s. Disk. d. Act.D Exp.). Damit kann eine somatische Herkunft der translierbaren RNA des 10 000 g-P weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Möglichkeit, daß die RNA des 10 000 g-P an membrangebundene Polysomen assoziiert ist, ist aus folgenden Gründen auszuschließen:
1. Als interne Strukturproteine sollten die Tubuline vornehmlich, wenn nicht ausschließlich, von freien Polysomen transliert werden (Blobel et al., 1975). So konnte auch nachgewiesen werden, daß der an Polysomen assoziierte Anteil der Tubulin-mRNA in larvalen Hodenanlagen mit freien Polysomen verbunden ist (Ergebnis nicht aufgeführt).
2. Andererseits finden Cleveland et al. (1978) Tubulin-mRNA außerdem in einer Fraktion membrangebundener Polysomen. Bei der hier verwendeten Isolierungsmethode sollten diese jedoch auch quantitativ abgelöst und erfaßt werden (Boshes, 1970; Noll, 1974).
3. Wenn das 10 000 g-P aktive Polysomen enthielte, so sollte man bereits in larvalen Hodenanlagen quantitative Unterschiede im Proteingehalt des 52 000 Dalton Bereichs zwischen X/Y und X/0 Tieren finden, weil der Anteil an translierbarer RNA im 10 000 g-P der X/0 Tiere fehlt oder zumindest stark reduziert ist.

[+)] In neuesten Untersuchungen (Kemphues et al.,1979) wird bei D. melanogaster ein Hoden-spezifisches ß2-Tubulin beschrieben, das in mutierter Form (ß2m) zu einer abnormen Spermiogenese führt. Hinweise auf ein Hoden-spezifisches ß-Tubulin gibt es auch bei D. hydei (Lassak, Nellen, unveröffentlicht). Es liegt nahe anzunehmen, daß der C/T-Peak 1 oder 2 (Abb. 17) auf die verminderte Synthese eines solchen Tubulins in den X/0 Tieren zurückzuführen ist.

4. Die Untersuchung der Proteine zeigt, daß die RNP-Fraktion des 10 000 g-P, in der die Translationsaktivität liegt, keine ribosomalen Proteine enthält.
5. Die polysomale Tubulin-mRNA adulter Hoden liegt in Form eines RNP--Partikels von etwa 40 S vor (Ergebnis nicht aufgeführt); die RNPs des 10 000 g-P, die die translierbare RNA enthalten, haben dagegen größere S-Werte und müssen deshalb anders organisiert sein.

Aus diesen Daten ist zu folgern, daß die im 10 000 g-P enthaltene translierbare mRNA nicht polysomalen Ursprungs ist. Das heißt, daß in larvalen Hodenanlagen wenigstens für Tubuline zwei unterschiedliche mRNA Populationen vorliegen: eine polysomale, von der die Tubuline in larvalen Hodenanlagen transliert werden und eine nicht polysomale, die in prämeiotischen Stadien nicht transliert wird, die aber an der Tubulinsynthese in postmeiotischen Stadien beteiligt ist.

Obwohl die Tubulinuntereinheiten in "überwiegend larvale" und "überwiegend adulte" Komponenten eingeteilt werden können (Kap. 3.3.3.), ist eine Zuordnung der in vitro Translationsprodukte der beiden mRNA-Fraktionen nicht möglich. Deshalb kann auch nicht entschieden werden, ob die Tubulin-mRNAs in den beiden Fraktionen für die gleichen oder für unterschiedliche Tubuline codieren.
Die Existenz einer mRNA in zwei verschiedenen Organisationsformen, nämlich in freien RNPs und in polysomalen RNPs wurde bereits in anderen Organismen nachgewiesen (Baglioni, 1974; Spohr et al., 1970; Bag et al., 1975; Darnbrough et al., 1976; Spirin, 1969). Für die freien RNPs werden verschiedene Funktionen vorgeschlagen, wobei die Möglichkeiten der Translationskontrolle und der Speicherung favorisiert werden. Nachgewiesen ist u.a. die Speicherung von Protamin-mRNA im Cytoplasma der Spermatocyten von Forellen (Iatrou et al., 1978) und von Tubulin-mRNA in Seeigeleiern (Raff et al., 1972). Ein Vergleich dieser RNA mit der RNA des 10 000 g-P ist naheliegend.
Tubulin-mRNA gehört zu der Messengergruppe mit einer besonders kurzen Halbwertszeit (Ben-Ze'ev et al., 1979): die Tubulinsynthese in Fibroblasten-Zellkulturen wird unter dem Einfluß von Actinomycin D im Vergleich zu anderen Polypeptiden am stärksten reduziert. Im Gegensatz dazu zeigt zumindest ein Teil der Tubuline in adulten Hoden von Dro-

sophila eine Synthese, die weniger von Actinomycin D beeinflußt wird, als die der meisten anderen Proteine. Hinzu kommt die Beobachtung, daß die Proteinsynthese nach einer Behandlung mit Actinomycin D in postmeiotischen Stadien nicht oder sehr viel schwächer als in prämeiotischen Stadien reduziert wird.
Der relativ schwache Einfluß von Actinomycin D auf die Proteinsynthese gilt nicht nur für die Tubuline, sondern auch für die beiden anderen Polypeptidgruppen, deren Synthese von der 10 000 g-P-RNA dirigiert wird. Auch diese beiden Produkte werden besonders stark in postmeiotischen Stadien transliert (Lassak, pers. Mitt.).
Alle diese Befunde sprechen dafür, daß in den larvalen Hodenanlagen mRNA in Form von "maskierten Messengern" (Gross, 1970; Humphrys, 1971) für spätere Entwicklungsstadien gespeichert wird und daß wenigstens ein Teil dieser RNA im 10 000 g-P enthalten ist. Es ist durchaus möglich, maskierte RNA in-vitro zu translieren, weil durch die Extraktion der RNA eine Maskierung, die in Form von Proteinen oder Sekundär- und Tertiärstruktur vorliegt, beseitigt werden kann (Humphrys, 1971).

Im 10 000 g-P aus X/0 Hodenanlagen liegt einerseits keine in vitro translierbare RNA für die Proteingruppen mit Molekulargewichten von 29 000, 39 000 und 52 000 Dalton vor, andererseits können beim molekularen Vergleich der 10 000 g-P-Fraktion aus X/Y und X/0 Tieren keine Unterschiede gefunden werden. Für diese Beobachtung gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:
1. Es gibt geringfügige Unterschiede zwischen der 10 000 g-P-RNA aus X/Y und X/0 Tieren, die eine elektrophoretische Auftrennung zwar nicht ermöglichen, aber einen wesentlichen Einfluß auf die physiologische Aktivität der RNA haben.
2. Die translierbare RNA ist im 10 000 g-P aus X/0 Hodenanlagen tatsächlich nicht vorhanden, weil sie nicht gespeichert werden kann und degradiert wird. Das Processing und die Verpackung der RNA in den X/Y Hodenanlagen nimmt jedoch so lange Zeit in Anspruch, daß nach einer Markierung von 24 Stunden noch nicht genügend radioaktives Material in der endgültigen Speicherform im 10 000 g-P vorliegt, um Unterschiede im C/T-Verhältnis erfassen zu können.

In beiden Fällen ist eine Veränderung der RNA oder der RNPs notwendig, die direkt oder indirekt mit der Anwesenheit der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen in Verbindung stehen muß.
Eine solche Modifikation könnte entweder durch Y-chromosomal codierte Moleküle bewirkt werden, die im Cytoplasma oder im Karyoplasma mit der mRNA in Wechselwirkung treten oder sie könnte direkt an den Lampenbürstenschleifen stattfinden. Die zweite Möglichkeit würde fordern, daß in den Spermatocytenkernen am Y-Chromosom auch RNA zu finden ist, die anderweitig codiert wird.
Dafür spricht einmal, daß Knust (1979) zeigen konnte, daß X-chromosomale oder autosomale RNA auch an Y-chromosomale DNA-Sequenzen hybridisieren kann. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß angereicherte Y-chromosomale DNA (nicht Y-chromosomale Sequenzen wurden durch einen 500fachen Überschuß an kalter DNA aus Weibchen kompetitiert) sowohl mit autosomal codierter RNA als auch mit der RNA an einigen Lampenbürstenschleifen hybridisiert (Schwochau, Knust, Nellen, unveröffentlicht).
Aufgrund dieser Befunde schien es lohnenswert, zu überprüfen, ob die 10 000 g-P-poly(A)$^+$-RNA ebenfalls an den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen zu finden ist und damit die Voraussetzungen für ein Processing autosomaler oder X-chromosomaler RNA an den Schleifen gegeben sind.

Bei einer in-situ Hybridisierung findet man in den Spermatocytenkernen eine strukturgebundene Markierung im Bereich der Tubulibänder (Abb. 26), während bei einer Hybridisierung auf die RNA in X/O Kernen eine Anhäufung von Silberkörnern an der Kernmembran auftritt, die Verteilung im restlichen Kernraum aber gleichmäßiger ist (Abb. 27). Die Beobachtung, daß die X/O Kerne stärker markiert sind als die X/Y Kerne, kann so interpretiert werden, daß die strukturgebundene RNA in den X/Y Kernen bereits mit Verpackungsproteinen versehen und deshalb für eine Hybridisierung weniger zugänglich ist, als die "freie", nicht strukturgebundene RNA in den X/O Kernen.
Weil in den Kernen aus X/O Tieren keine signifikant stärkere Markierung über den zum Teil gut erkennbaren und freiliegenden Autosomen zu finden ist, kann auch ausgeschlossen werden, daß die strukturgebundene Markierung in den X/Y Kernen in Wirklichkeit durch ei-

ne Hybridisierung an die Autosomen hervorgerufen wird.
Weil nicht bekannt ist, welche RNAs neben den translierbaren Messengern im 10 000 g-P vorkommen, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die hybridisierenden Sequenzen wirklich homolog zu den mRNAs sind. Deshalb ist auch eine strukturgebundene Hybridisierung an den Lampenbürstenschleifen kein endgültiger Beweis dafür, daß Sequenzen der translierbaren Messenger in der RNA an den Schleifen enthalten sind. Die Befunde unterstützen jedoch diese Annahme und lassen sich gut in ein Modell zur Funktion der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen für die Regulation der Spermiogenese einfügen, das die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Untersuchungen berücksichtigt:

1. Die DNA-Achse der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen besteht aus repetitiven Sequenzen, die als "Regulatorgene" bezeichnet werden. Die gleichen Sequenzen sind auch Bestandteil autosomaler oder X-chromosomaler Gene und werden zusammen mit den Strukturgenen transcribiert.

Für diesen Teil des Modells spricht einmal die Existenz mittelrepetitiver Sequenzen in der Y-chromosomalen DNA (Renkawitz, 1978; Hennig, 1973) und die Tatsache, daß eine Fraktion autosomaler und/oder X-chromosomaler RNA bevorzugt mit Y-chromosomaler DNA hybridisiert (Knust, 1979)

2. In den Kernen primärer Spermatocyten werden unter anderem autosomale und/oder X-chromosomale Strukturgene transcribiert, die die "Regulator"-Sequenzen enthalten. Außerdem werden an den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen lange Transcripte synthetisiert, die hintereinander viele "Regulator"-Sequenzen tragen und nicht von der DNA-Achse abgelöst werden.

Eine sehr hochmolekulare, Y-spezifische RNA, die dieses Modell fordern würde, wurde von Schwochau (unveröffentlicht) nachgewiesen.

3. Die autosomale oder X-chromosomalen Transcripte, die "Regulator"-Sequenzen enthalten, werden durch RNA-RNA oder RNA-Protein Wechselwirkungen an die Transcripte der Lampenbürstenschleifen gebunden und dort für eine Speicherung vorbereitet; die RNA ist

dadurch vor einer Degradation geschützt. Fehlen die Schleifen, so wird diese RNA degradiert.

In den Kernen primärer Spermatocyten von X/Y Tieren wird hochmolekulare RNA angereichert, während in X/O Tieren ein vergleichsweise geringerer Anteil an hochmolekularer und ein größerer Anteil an niedermolekularer RNA gefunden wird (Knust, 1979). In den Spermatocytenkernen der X/Y Tiere ist weiterhin eine Anreicherung RNA-bindender Proteine im Vergleich zu X/O Kernen zu beobachten (Kloetzel, 1979). Es konnte nachgewiesen werden, daß diese Proteine bestimmte RNA-Sequenzen, die sowohl in den Kernen als auch im Cytoplasma vorkommen, erkennen können (Kloetzel, pers. Mitt.) und mit der hochmolekularen RNA in den Spermatocytenkernen verbunden sind (Knust, 1979). Diese Proteine könnten deshalb für Wechselwirkungen zwischen mRNA und den Y-chromosomalen Lampenbürstentranscripten verantwortlich sein und, weil ihre Gene nicht auf dem Y-Chromosom liegen, könnte hier auch der Grund für nicht Y-chromosomale Mutationen liegen, die die Lampenbürstenschleifen und damit die Fertilität beeinflussen (Lifschytz et al., 1977).

4. Nach ihrer Verpackung verläßt die mRNA die Lampenbürstenschleifen und wandert zur endgültigen Speicherung ins Cytoplasma.

Im Cytoplasma von X/Y Hodenanlagen wurden gespeicherte mRNPs gefunden, die in vitro translierbar sind und in X/O Tieren nicht nachweisbar sind. Die Speicherung dieser mRNPs ist also von der Anwesenheit des Y-Chromosoms abhängig. Eine cDNA zu der Fraktion, die die gespeicherte mRNA enthält, hybridisiert in-situ vermehrt über Y-chromosomalen Schleifenstrukturen; dadurch wird die Vermutung unterstützt, daß es gemeinsame Sequenzen zwischen gespeicherter RNA und der RNA an den Lampenbürstenschleifen gibt.

5. Nach der Meiose werden die bis dahin gespeicherten mRNAs tranliert. Sie dirigieren die Synthese der Proteine, die für den Aufbau und die Differenzierung der Spermatiden notwendig sind.

In postmeiotischen Stadien findet keine Transcription mehr statt, wohl aber eine Proteinsynthese (Hennig, 1969; Lassak, 1979), die deshalb von gespeicherter mRNA dirigiert werden muß. Von der gespeicherten

mRNA in der 10 000 g-P-Fraktion können in vitro drei Proteingruppen transliert werden, die mit den wesentlichen Proteinen identisch sind, die in postmeiotischen Stadien in vivo synthetisiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Synthese dieser Proteine von einer RNA-Neusynthese weitgehend unabhängig ist.

Dieses Modell erklärt auch die folgenden quantitativen Effekte der Lampenbürstenschleifen: Tiere, die zwei Y-Chromosomen besitzen, bilden etwa doppelt so lange Spermien wie normale X/Y Männchen (Hess, 1971); weil mehr Y-chromosomale Transcripte zur Verfügung stehen, werden größere Mengen an RNA vor einer Degradation geschützt und in den postmeiotischen Stadien wird mehr Protein synthetisiert, als zum Aufbau normal langer Spermien benötigt wird. Es ist nicht anzunehmen, daß die mRNA aus X/O Tieren, die nicht gespeichert werden kann, quantitativ degradiert wird. Einige Moleküle werden erhalten bleiben, sodaß zwar alles Material zur Verfügung steht, die Menge jedoch für eine Spermiendifferenzierung nicht ausreicht.
Weil eine Lampenbürstenschleife nicht durch eine andere ersetzt werden kann, der Ausfall von Tubulibändern, Keulen und Schlingen z.B. nicht durch eine Verdoppelung der Fäden und des Pseudonukleolus kompensiert wird, muß man annehmen, daß unterschiedliche Schleifen auch unterschiedliche "Regulatorgene" enthalten und für die Speicherung unterschiedlicher RNA verantwortlich sind. Die Anzahl und die Kombination der Lampenbürstenschleifen, die ausgespult sind, bestimmen, in welchem Stadium der Spermiogenese Defekte auftreten und welche Organellen vorwiegend betroffen sind (Meyer, 1968). Dies wird verständlich, wenn man annimmt, daß die verschiedenen mRNAs, deren Speicherung durch verschiedene Lampenbürstenschleifen ermöglicht wird, zu unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung benötigt werden und am Aufbau und der Organisation verschiedener Organellen beteiligt sind.
Es wurde z.B. beobachtet, daß in Tieren, denen Tubulibänder, Keulen und Schlingen fehlen, die Flagellenbildung besonders stark gestört ist. In den Hoden dieser Tiere ist ebenfalls die Synthese der Tubuline reduziert (Kap. 3.3.1., Kap. 3.3.2.) und in der Fraktion, die gespeicherte mRNA enthält, sind in diesen Tieren wahrscheinlich keine translierbaren Tubulin-mRNAs vorhanden (Ergebnis nicht aufgeführt).

Alle Ergebnisse lassen sich ebenso durch ein zweites Modell erklären: danach könnten bestimmte autosomale und/oder X-chromosomale Strukturgene in repetitiver Form außerdem auf den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen vorliegen und im Stadium der primären Spermatocyten für eine vermehrte Synthese der mRNA verantwortlich sein, die für eine postmeiotische Translation gespeichert werden muß.

Aufgrund der vorliegenden Daten ist anzunehmen, daß für eine geordnete Spermiogenese mRNA notwendig ist, die im Stadium der primären Spermatocyten transcribiert wird und nur in Gegenwart der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen in ausreichender Menge gespeichert werden kann. Diese gespeicherte mRNA dirigiert in postmeiotischen Stadien die Synthese essentieller Proteine (z.B. zweier Tubulinuntereinheiten) deren Ausfall keine vollständige Differenzierung und damit auch keine Ausbildung fertiler Spermien erlaubt.

Wechselwirkungen zwischen RNA-Sequenzen, die von verschiedenen Chromosomen transcribiert werden, wurden bereits als Regulationsmechanismus diskutiert (Britten et al., 1969; Davidson et al., 1979). Das hier vorgestellte Modell, das mit vielen Ergebnissen übereinstimmt, schlägt darüber hinaus eine Funktion für die Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen von Drosophila vor, die bisher wenig beachtet wurde und bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden sollte.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die prämeiotisch synthetisierte RNA aus den larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei untersucht, und es werden ihre Beziehungen zu den postmeiotischen Störungen der Spermatogenese in Y-defizienten Tieren beschrieben.
Mit dem Ausfall der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen in den primären Spermatocyten ist eine verminderte Synthese, aber kein völliger Ausfall verschiedener Proteine in postmeiotischen Stadien verbunden. Eine ausschließlich Y-chromosomale Codierung dieser Proteine ist damit ausgeschlossen.
Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei diesen Proteinen unter anderem um zwei Tubulinuntereinheiten und um zwei möglicherweise Tubulinassoziierte Proteine handelt.
Aus prämeiotischen Spermatogenesestadien von Wildtyp-Männchen wurde eine Fraktion isoliert (10 000 g-P), in der nicht-polysomale cytoplasmatische RNPs enthalten sind, deren poly(A)$^+$-RNA in vitro die Synthese von drei Proteingruppen dirigiert: einer mit einem Molekulargewicht von 52 000 Dalton, die sich aus zwei Tubulinuntereinheiten und einem möglicherweise Tubulin-assoziierten Protein zusammensetzt und zwei weiterer mit Molekulargewichten von 29 000 und 39 000 Dalton. Die mRNA für alle drei Proteingruppen ist in RNPs enthalten, die zwischen 60 und 80 S sedimentieren; die Messenger selbst haben S-Werte zwischen 14 und 18 S.
Mit der entsprechenden RNA-Fraktion aus den Hodenanlagen von X/O Tieren können diese Proteine in vitro nicht synthetisiert werden.
Die in vivo Synthese der drei Proteingruppen in adulten Hoden ist von einer Transcriptionshemmung mit Actinomycin D im Vergleich zu anderen Proteinen am wenigsten betroffen; daraus ist zu schließen, daß sie von gespeicherter RNA transliert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden von Lassak überein, der Proteine mit den selben Molekulargewichten als die wesentlichen neusynthetisierten Komponenten in postmeiotischen Spermatogenesestadien nachweist, in denen keine Transcription mehr stattfindet.
Durch in-situ Hybridisierungen konnten Sequenzen der 10 000 g-P-RNA in den Kernen primärer Spermatocyten lokalisiert werden: man findet

eine strukturgebundene Markierung im Bereich der Tubulibänder, während in den Spermatocytenkernen der X/O Tiere eine Hybridisierung in der Nähe der Kernmembran zu beobachten ist.
Aufgrund der vorliegenden Daten wird ein Modell vorgestellt, daß eine regulierende Funktion der Lampenbürstenschleifen bei der Verpakkung und Prozessierung autosomaler und/oder X-chromosomaler Messenger vorschlägt.

In dieser Arbeit werden erstmals Ergebnisse dargestellt, die die Ursachen für die Sterilität Y-defizienter Tiere auf molekularer Ebene erklären können: es konnte gezeigt werden, daß die Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen in prämeiotischen Spermatogenesestadien die Speicherung von mRNA ermöglichen, die für die Translation wesentlicher Proteine, unter anderem zweier Tubuline, in postmeiotischen Stadien verantwortlich ist und damit die Ausbildung fertiler Spermien erlaubt.

Nachtrag

Nach Abschluß dieser Untersuchungen erschien eine Arbeit von Lifschytz (J. Mol. Biol., 133, 267 - 277, 1979) in der Hinweise darauf gegeben werden, daß die Y-chromosomale DNA von D. hydei viele Sequenzen enthält, die auch auf anderen Chromosomen vorliegen.
Diese Sequenzen, die bei der von Lifschytz angewandten Methode zur Clonierung Y-spezifischer DNA nicht erfaßt werden, könnten entweder den "Regulatorgenen" oder den Y-chromosomalen "repetitiven Strukturgenen" entsprechen, die in dem vorgeschlagenen Modell beschrieben werden.
Lifschytz erwähnt weiterhin, daß bei einer in vitro Translation von RNA aus X/Y und X/O Hoden nur geringfügige Unterschiede in den in vitro Tranlationsprodukten nachweisbar sind. Dieses Ergebnis ist zu erwarten, wenn die RNA nicht wie hier beschrieben fraktioniert wird. Die von unfraktionierter RNA in vitro synthetisierten Proteine können nur geringfügige qualitative Unterschiede aufweisen, weil die Translationsaktivität der gespeicherten mRNA mit großer Wahrscheinlichkeit von polysomaler RNA überdeckt wird.

VI. Literaturverzeichnis

Bag, J., S. Sarkar (1975) Cytoplasmic nonpolysomal messenger ribonucleoprotein containing actin messenger RNA in chicken embryonic muscles. Biochem. 14, 3800-3807

Baglioni, G. (1974) Nonpolysomal messenger RNA. Ann. N.Y. Acad. Sci. 241, 183-190

Beck, H. (1976) New compound(1) chromosomes and the production of large quantities of X/0 males in Drosophila hydei. Genet. Res., Camb. 26, 313-317

Ben-Ze'ev, A., S. R. Farmer, S. Penman (1979) Mechanisms of regulating tubulin synthesis in cultured mammalian cells. Cell 17, 319-325

Bibring, T., J. Baxandall, S. Denslow, B. Walker (1976) Heterogeneity of the alpha subunit of tubulin and the variability of tubulin within a single organism. J. Cell Biol. 69, 301-312

Blobel, G., B. Dobberstein (1975) Transfer of proteins across membranes. J. Cell Biol. 67, 835-851

Bonner, W. M., R. A. Laskey (1974) A film detection method for ^{3}H labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamidgels. Eur. J. Biochem. 46, 83-88

Boshes, R. A. (1970) Drosophila polyribosomes. J. Cell Biol. 46, 477-490

Boyd, J. B., H. D. Berendes, H. Boyd (1968) Mass preparation of nuclei from the larval salivary glands of Drosophila hydei. J. Cell Biol. 38, 369

Britten, R. J., E. H. Davidson (1969) Gene regulation for higher cells: a theory. Science 165, 349-357

Bryan, R. N., G. A. Cutter, M. Hayashi (1978) Separate mRNAs code for tubulin subunits. Nature 272, 81-83

Callan, H. G. (1957) The lampbrush chromosomes of Sepia officinalis L. and Scyllium catulus Cuv. and their structural relationship to the lampbrush chromosomes of amphibia. Pubbl. Staz. Zool. Napoli 29, 329

Callan, H. G. (1963) The nature of lampbrush chromosomes. Int. Rec. Cytol. 15, 1-34

Callan, H. G., L. Lloyd (1960) Lampbrush chromosomes. Int. Symp. on new approaches in cell biology; ed. P. M. B. Walker 23 Academic Press, London

Darnbrough, C., P. J. Ford (1976) Cell-free translation of mRNA from oocytes of Xenopus laevis. Dev. Biol. 50, 285-301

Davidson, E. H., R. J. Britten (1979) Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences. Science 204 1052-1059

Denhardt, D. T. (1966) A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 641-646

Egly, J.-M., Stevenin, J. (1977) Les ribonucléoprotéines contenant les RNA hétérogènes nucléaires et les RNA messageres cytoplasmiques. Path. Biol. 25, 741-754

Gall, J. G. (1963) Chromosomes and cytodifferentiation. In: Cytodifferential and macromolecular synthesis. 119 Academic Press, N. Y.

Glisin, V., R. Crkvenjakoc, C. Byus (1974) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochemistry 13, 2633-2637

Gross, P. R. (1967) The control of protein synthesis in embryonic development and differentiation. Curr. Top. Devel. Biol. 2, 1-46

Hennen, S., S. Mizuno, H. C. Macgregor (1975) In-situ hybridization of ribosomal DNA labaled with ^{125}iodine to metaphase and lampbrush chromosomes from newts. Chromosoma (Berl.) 50, 349-369

Hennig, W. (1967) Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Lampenbürsten-Y-Chromosoms in der Spermatogenese von Drosophila. Chromosoma (Berl.) 22, 294-357

Hennig, W. (1968) Ribonucleic acid synthesis of the Y-chromosoe of Drosophila hydei. J. Mol. Biol. 38, 227-239

Hennig, W., O. Leoncini, I. Hennig (1973) Heterochromatin, simple sequence DNA and differential staining patterns in Drosophila chromosomes. In: Pfeiffer, R. A. (ed.), Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in man. Schattauer, Stuttgart und New York, 87-99

Hennig, W., G. F. Meyer, I. Hennig, O. Leoncini (1974) Structure and function of the Y-chromosome of Drosophila hydei. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 673-683

Herzog, W., K. Weber (1978) Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Eur. J. Biochem. 92, 1-8

Hess, O. (1965) Strukturdifferenzierungen im Y-Chromosom von Drosophila hydei und ihre Beziehung zu Genaktivitäten. III Sequenz und Lokalisation der Schleifenbildungsorte. Chromosoma (Berl.) 16, 222-248

Hess, O., G. F. Meyer (1963) Chromosomal differentiation of the lampbrush type formed by the Y-chromosome in Drosophila hydei and D. neohydei. J. Cell Biol. 16, 527-539

Hess, O. (1968) The function of the lampbrush loops formed by the Y-chromosome of Drosophila hydei in spermatocyte nuclei. Molec. Gen. Genet. 103, 58-71

Hess, O., G. F. Meyer (1968) Genetic activities of the Y-chromosome in Drosophila during spermatogenesis. Advan. Genet. 14, 171-223

Hess, O. (1971) Lampenbürstenchromosomen. In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie; Springer, Berlin, Heidelberg, New York 215-281

Hess, O. (1974) Local structural variations of the Y-chromosome of Drosophila hydei and their correlation to genetic activity. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 663-671

Humphrys, T. (1971) Measurement of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. Dev. Biol. 26, 201-208

Iatrou, K., A. W. Spira, G. H. Dixon (1978) Protamine messenger RNA: evidence for early synthesis and accumulation during spermatogenesis in rainbow trout. Dev. Biol. 64, 82-98

Kemphues, K. J., R. A. Raff, T. C. Kaufman, E. C. Raff (1979) Mutation in a structural gene for a ß-tubulin specific to testis in Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3991-3995

Kloetzel, P.-M. (1976) Untersuchungen zur Proteinsynthese in larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei mit Hilfe von exponentiellen SDS-Polyacrylamidgelgradienten. Diplomarbeit, Math. Nat. Fakultät, Universität Düsseldorf

Kloetzel, P.-M. (1979) Molekulare Untersuchung der Proteine in frühen Spermatogenesestadien von Drosophila hydei und deren Beziehung zu den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen. Dissertation, Math. Nat. Fakultät, Universität Düsseldorf

Knust, E., P.-M. Kloetzel, M. Schwochau (1978) Isolation and characterization of ribonucleoprotein particles from nuclei of primary spermatocytes of Drosophila hydei. 12th FEBS-Meeting Dresden, Abstract 1104

Knust, E. (1979) Ribonukleoproteinpartikel aus Kernen primärer Spermatocyten von Drosophila hydei: Charakterisierung der RNA und ihre Beziehung zu den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen. Dissertation, Math. Nat. Fakultät Universität Düsseldorf

Laskey, R. A., A. D. Mills (1975) Quantitative film detection of ^{3}H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56, 335-341

Lassak, H.-F. (1975) Die Wirkung von -Amanitin auf die RNA-Synthese in larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei. Diplomarbeit, Math. Nat. Fakultät Universität Düsseldorf

Lassak, H.-F., P.-M. Kloetzel, M. Schwochau, K.-H. Glätzer (1979) RNA synthesis, RNA storage and transcriptional products in the spermatogenesis of Drosophila hydei. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 314

Lifschytz, E., D. Hareven (1977) Gene expression and the control of spermatid morphogenesis in Drosophila melanogaster. Dev. Biol. 58, 276-294

Lifschytz, E. (1979) A procedure for cloning and identification of Y-specific middle repetitive sequences in Drosophila hydei. J. Mol. Biol. 133, 267-277

Lindsley, D. L., E. H. Grell (1969) Spermatogenesis without chromosomes in Drosophila melanogaster. Genetics 61, 69-78

McEwen, C. R. (1967) Tables for estimating sedimentation through linear concentration gradients of sucrose solution. Anal. Biochem. 20, 114-149

McKenzie, S. L., M. Meselson (1977) Translation in vitro of Drosophila heat-shock messages. J. Mol. Biol. 117, 279-283

Meyer, G. F. (1968) Spermiogenese in normalen und Y-defizienten Männchen von Drosophila melanogaster und D. hydei. Z. Zellforsch. 84, 141-175

Mirault, M.-E., K. Scherrer, L. Hansen (1971) Isolation of preribosomes from HeLa cells and their characterization by electropho-

resis on uniform and exponential-gradient-polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 23, 372-386

Nellen, W. (1975) Die Wirkung von Actinomycin D auf die RNA-Synthese in larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei. Diplomarbeit, Math. Nat. Fakultät Universität Düsseldorf

Nellen, W. (1979) Male fertility in Drosophila hydei correlated to storage of a specific mRNA. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 333

Noll, M., M. M. Burger (1964) Membrane-bound and free polysomes in transformed and untransformed fibroblast cells. J. Mol. Biol. 90, 215-236

O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021

Old, R. W., H. G. Callan, K. W. Gross (1977) Localization of histone gene transcripts in newt lampbrush chromosomes by in-situ hybridization. J. Cell Sci. 27, 57-79

Olivieri, G., A. Olivieri (1965) Autoradiographic studies of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in Drosophila melanogaster. Mutation Res. 2, 366-371

Olmsted, J. B., K. Carlson, R. Klebe, F. Ruddle, J. Rosenbaum (1970) Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 129-136

Pardue, M.-L., J. G. Gall (1975) Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. Meth. Cell Biol. 10, 1-16

Pukkila, P. J. (1975) Identification of lampbrush chromosome loops which transcribe 5 S ribosomal RNA in Notophthalmus (Triturus) viridescens. Chromosoma (Berl.) 53, 71-89

Raff, R. A., H. V. Colot, S. E. Selvig, P. R. Gross (1972) Oogenic origin of messenger RNA for embryonic synthesis of microtubule proteins. Nat. 235, 211-214

Renkawitz, R. (1968) Characterization of two moderately repetitive DNA components localized within the ß-heterochromatin of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl.) 66, 225-236

Rosen, J. M., S. W. Barker (1976) Quantutation of casein messenger ribonucleic acid sequences using a specific complementary DNA hybridization probe. Biochemistry 15, 5272-5280

Schäfer, U. (1975) Vitalität und Sterilität in Drosophila hydei X D. neohydei-Hybriden. Dissertation Math. Nat. Fakultät Universität Düsseldorf

Schäfer, U. (1978) Analysis of two heterosome-autosome translocations in D. hydei. DIS 53, 120

Schneider, I. (1964) Differentiation of larval Drosophila eye-antennal discs in vitro. J. Exptl. Zool. 156, 91-104

Snow, M. H. L., H. G. Callan (1969) Evidence for a polarized movement of the lateral loops of newt lampbrush chromosomes during oogenesis. J. Cell Sci. 5, 1-12

Spirin, A. S. (1969) Informosomes. Eur. J. Biochem. 10, 20-35

Spohr, G., N. Granboulan, C. Morel, K. Scherrer (1970) Messenger RNA in HeLa cells. Eur. J. Biochem. 17, 296-318

Stephens, R. E. Primary structural differences among tubulin subunits from flagella, cilia, and the cytoplasm. Biochemistry 17, 2882-2891

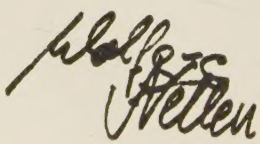
Wilson, L., J. Bryan, A. Ruby, D. Mazis (1970) Precipitation of proteins by vinblastin and calcium ions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 807-814

VII. Anmerkungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Schwochau für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. O. Hess für sein Interesse und seine Unterstützung.
Herrn Dr. P.-M. Kloetzel, Herrn Dr. D. Mischke und den Dipl. Biol. E. Knust und H.-F. Lassak danke ich für die gute Zusammenarbeit und für anregende Diskussionen sowie für die Hilfe bei der Materialbeschaffung, an der auch Frau U. Zielke und Frau Dipl. Biol. B. Grunert beteiligt waren.
Frau Ch. Mischke, Frau P. Ritter und Frau M. Brand bin ich für die Hilfe bei der Fliegenaufzucht zu besonderem Dank verpflichtet.
Herrn Dr. K.-H. Glätzer gilt mein Dank für Hinweise bei cytologischen Untersuchungen und Diskussionsbeiträge zu den Tubulinuntersuchungen.
Ich danke Herrn Prof. Dr. J. W. Beard für die Überlassung der Reversen Transcriptase und Herrn Dr. G. Hiller für die Überlassung von Actin und Tubulin.
Die Arbeit wurde durch Mittel unterstützt, die Herrn Prof. Dr. M. Schwochau von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt wurden (Schw. 170/5).
Die Dissertation wurde im Rahmen der Graduiertenförderung im Institut für Genetik durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel "Male fertility in *Drosophila hydei* correlated to storage of a specific mRNA" als "Abstract" in Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, *360*, Seite 333, 1979 veröffentlicht.

VIII. Lebenslauf

Name:	Wolfgang Nellen
Geburtsort und Datum:	16.9.1949 in Velbert
Eltern:	Alfred Nellen, Kaufmann
	Irmgard Nellen, geb. Bodenburg, Kauffrau
Wohnsitz:	4000 Düsseldorf, Dorotheenstraße 68
Schulbesuch:	1956 - 1960 Pestalozzischule Velbert
	1960 - 1968 Städtisches Jungengymnasium Velbert
	Abitur im Juni 1968
Bundeswehr:	Juli 1968 bis Dezember 1969
Hochschulstudium:	seit WS 1969/70 Studium der Biologie an der Universität Düsseldorf
	WS 1970/71 bis SS 1971 zusätzliches Studium der Anglistik an der Universität Düsseldorf
	WS 1971 Vordiplom
	WS 1975 Diplom, Hauptfach Genetik
	Die Diplomarbeit wurde im Institut für Allgemeine Biologie angefertigt
	seit 1976 Anfertigung der Dissertation
Praktische Tätigkeiten:	seit 1972 studentische bzw wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Allgemeine Biologie
	1975 - 1977 nebenberufliche Lehrkraft am Geschwister-Scholl-Gymnasium, Düsseldorf
	1977 - 1979 Unterricht im Fach Biologie an der staatlichen Lehranstalt für Medizinisch-Technische Assistentinnen in Düsseldorf

Düsseldorf, im November 1979